# Nachweis und Charakterisierung einer Retrovirus assoziierten Protease: »in vitro« Spaltung eines Vorläufermoleküls und Identifizierung seiner Endprodukte

DISSERTATION
zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften

der Fakultät für Biologie
der Eberhard-Karls-Universität Tübingen

vorgelegt von
RUDOLF KARL HAFENRICHTER
aus Heidelberg

1984

[illegible]

# Nachweis und Charakterisierung einer Retrovirus assoziierten Protease: »in vitro« Spaltung eines Vorläufermoleküls und Identifizierung seiner Endprodukte

DISSERTATION
zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften

der Fakultät für Biologie
der Eberhard-Karls-Universität Tübingen

vorgelegt von
RUDOLF KARL HAFENRICHTER
aus Heidelberg

1984

Tag der mündlichen Prüfung: 27. Juli 1984

| | |
|---|---|
| Dekan: | Professor Dr. E. Kulzer |
| 1. Berichterstatter: | Professor Dr. D. Ammermann |
| 2. Berichterstatter: | Professor Dr. U.H. Koszinowski |

*gedruckt bei H.- J. Köhler · Reprografischer Betrieb · Tübingen*

An dieser Stelle möchte ich besonders Herrn Dr. H.-J. Thiel danken, der die finanziellen Voraussetzungen für diese Arbeit geschaffen und in vielen Gesprächen mit seinem Rat und seinen Ideen auch entscheidend zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen hat.

Weiterhin gilt mein Dank

- Herrn Professor Dr. W. Schäfer am Max-Planck-Institut für Virusforschung in Tübingen und Herrn Dr. J. Schneider an der Universität Freiburg, welche mir größere Mengen gereinigtes Virus zur Verfügung stellten,
- Frau E. Heimbrand, Frau G. Schäfer und Herrn E.M. Broughton für ihre Mithilfe bei der Durchführung des Projektes,
- Herrn Dr. F. Weiland und Herrn D. Härtner, welche die elektronenmikroskopischen Arbeiten durchführten,
- den Herren H. Riekert, R. Straub und W. Wiedmaier von der Feinmechanischen Werkstatt für die Herstellung verschiedener Geräte und ihren Rat und ihre Hilfe bei technischen Problemen sowie Herrn E. Blum für die Wartung der Geräte
- Herrn P. Schröter für seine Mithilfe bei der Anfertigung der Abbildungen.

Diese Arbeit wurde am Institut für Impfstoffe der Bundesforschungsanstalt für Viruskrankheiten der Tiere in Tübingen unter der Anleitung von Herrn Dr. H.-J. Thiel angefertigt, mit Unterstützung der Deutschen Forschungsgemeinschaft.

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41536514_0004

# I N H A L T S Ü B E R S I C H T


| | | |
|---|---|---|
| 1. | EINLEITUNG | 7 |
| 2. | MATERIAL UND METHODEN | 13 |
| 2.1 | Reagenzien | 13 |
| 2.2 | Lösungen und Puffer | 14 |
| 2.3 | Geräte und Laborhilfsmittel | 15 |
| 2.4 | Zellen | 15 |
| 2.5 | Viren | 16 |
| 2.6 | Markierung von Viruspartikel mit radioaktivem $^{3}$H-Leucin, $^{3}$H-Prolin, $^{3}$H-Myristylsäure und $^{35}$S-Cystein | 16 |
| 2.7 | Viruspartikelreinigung | 16 |
| 2.8 | Bestimmung der Radioaktivität der gereinigten Viruspartikel | 17 |
| 2.9 | "in vitro" Spaltung" | 17 |
| 2.10 | Inhibition der "in vitro" Spaltung von SSV p65 durch FLV | 18 |
| 2.11 | Vorbereitung der Proben für die Analyse | 18 |
| 2.12 | Natriumdodecylsulfat Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) der viralen Proteine | 18 |
| 2.13 | Fixierung, Färbung und Entfärbung der SDS-PAGE | 19 |
| 2.14 | Vorbereitung der SDS-PAGE für die Fluorographie | 19 |
| 2.15 | Fluorographie der SDS-PAGE | 19 |
| 2.16 | Proteinbestimmung nach Lowry | 20 |
| 3. | ERGEBNISSE | 21 |
| 3.1 | "in vitro" Spaltung von SSV p65 durch FLV | 21 |

| | | |
|---|---|---|
| 3.1.1 | Ausgangsbedingungen | 21 |
| 3.1.2 | Verschiedene Behandlungen des Testansatzes | 24 |
| 3.1.3 | Detergenskonzentration | 26 |
| 3.1.4 | pH-Optimum | 28 |
| 3.1.5 | DTT-Abhängigkeit | 29 |
| 3.1.6 | Inkubationstemperatur | 30 |
| 3.1.7 | Spaltung unter optimierten Bedingungen | 32 |
| 3.2 | Eigenschaften der im FLV enhaltenen enzymatischen Aktivität | 32 |
| 3.2.1 | Stabilität bei höheren Temperaturen | 32 |
| 3.2.2 | Stabilität bei niederen Temperaturen | 35 |
| 3.2.3 | Verschiedene Detergentien | 36 |
| 3.2.4 | Inhibition | 38 |
| 3.3 | Lokalisation der im FLV enthaltenen enzymatischen Aktivität | 43 |
| 3.3.1 | Elektronenmikroskopische Untersuchungen | 43 |
| 3.3.2 | Untersuchungen "in vitro" | 44 |
| 3.4 | Verschiedene Markierungen des SSV p65 | 46 |
| 3.4.1 | $^{3}$H-Leucin Markierung | 47 |
| 3.4.2 | $^{35}$S-Cystein Markierung | 47 |
| 3.4.3 | $^{3}$H-Prolin Markierung | 48 |
| 3.4.4 | $^{3}$H-Myristylsäure Markierung | 49 |
| 4. | DISKUSSION | 51 |
| 5. | ZUSAMMENFASSUNG | 58 |
| 6. | LITERATURVERZEICHNIS | 60 |

7. ABBILDUNGEN 66

8. LEBENSLAUF 90

Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen

| | | |
|---|---|---|
| AMV | = | Avian Myeloblastosis Virus |
| APS | = | Ammoniumpersulfat |
| cpm | = | "counts per minute" (= Impulse pro Minute) |
| d | = | Dalton (Molekulargewichts-angabe) |
| DOC | = | Desoxycholsäure |
| DTT | = | Dithiothreitol |
| EDTA | = | Äthylendiamintetraessigsäure |
| "env" | = | "envelope" (Hülle) |
| FeLV | = | Felines Leukämie Virus |
| FKS | = | fötales Kälberserum |
| FLV | = | Friend Leukämie Virus |
| "gag precursor" | = | Vorläufermolekül der "gag" Proteine |
| "gag" | = | "group specific antigens" (gruppenspezifische Antigene) |
| K | = | Kilodalton (Molekulargewichts-angabe) |
| mM | = | milli Molar |
| Mo-MuLV | = | murines Moloney Leukämie Virus |
| NP | = | "non producer" (nicht Virus produzierend) |
| NP 40 | = | Nonidet P 40 |
| NRK | = | "normal rat kidney" (normale Rattennierenzellen) |
| PBS | = | "Phosphat buffered saline" (Phosphat gepufferte Kochsalz-lösung) |
| $pr65^{gag}$ | = | "gag precursor" = Vorläufer-molekül der "gag" Proteine |
| SDS | = | Sodiumdodecylsulfat |
| SDS-PAGE | = | Natriumdodecylsulfat-Polyacryl-amidgelelektrophorese |
| SSAV | = | "simian sarcoma associated |

| | | |
|---|---|---|
| | | virus" (Helfervirus aus dem SSV(SSAV)Komplex) |
| SSV | = | "simian sarcoma virus" (Sarcom-virus aus dem SSV(SSAV) Komplex) |
| Upm | = | Umdrehungen pro Minute |

## 1. EINLEITUNG

Die Familie der RNS-Tumorviren (Retroviridae) umfaßt Virusarten, die durch (1) zwei identische Moleküle RNS als genetisches Material, (2) eine spezifische Morphologie (Abb.1) und (3) das Enzym reverse Transkriptase charakterisiert sind. Die Bezeichnung Retrovirus deutet auf eine besondere Eigenschaft dieser Viren hin: Ihr genetisches Material, die RNS, wird mit Hilfe eines Enzymes, der reversen Transkriptase, in DNS umgesetzt, und anschließend in das Genom der Wirtszelle integriert.

Es wird unterschieden zwischen exogenen, d.h. horizontal übertragenen und endogenen, d.h. vertikal, in der Keimbahn weitergegebenen Retroviren. Zu den Oncovirinae, einer Subfamilie der Retroviridae, gehören die B-, C-, und D-Typ Retroviren; diese werden aufgrund ihrer Feinstruktur, der Beschaffenheit ihrer Strukturproteine und der Eigenschaften ihrer reversen Transkriptase voneinander unterschieden.

Viele der C-Typ-Retroviren können sich vermehren (replikationskompetente Retroviren, auch als "Helferviren" bezeichnet), veranlassen aber zumindest in der Gewebekultur keine Transformation der Zellen (Fibroblasten), d.h. deren Umwandlung in Tumorzellen. Andere Retroviren führen diese in relativ kurzer Zeit herbei ("in vitro" transformierende Retroviren). Das Genom der letzteren enthält eine als "onc"-Gen oder Onkogen ("onc" für onkogen) bezeichnete Information, welche für die Einleitung und Aufrechterhaltung der Transformation verantwortlich ist. Die verschiedenen "in vitro" transformierenden Retroviren sind durch die Rekombination von Helfervirusgenomen mit normalen zellulären Genen entstanden. Diese in der Evolution sehr konservierten Gene werden auch als Proto-onkogene bezeichnet. Die beiden Enden des Genoms des neu entstandenen

transformierenden Virus stammen vom Helfervirus, während das virale "onc"-Gen (das ursprünglich zelluläre Gen) zwischen diesen Sequenzen liegt. Die Rekombination zwischen Helfervirusgenomen und zellulären Genen führte in den meisten Fällen zum Verlust von Helfervirusgenen, die für gewisse Virusstrukturproteine kodieren. Die Folge davon ist, daß die meisten "in vitro" transformierenden Retroviren replikationsdefekt sind. Wird eine Zielzelle lediglich von einem solchen replikationsdefekten Virus infiziert, so entsteht eine NP-Zelle (für "non producer" = nicht Virus produzierend), die zwar transformiert ist, aber kein Virus produziert. Nach Überinfektion dieser Zelle mit einem Helfervirus wird neben ihm auch das defekte Virus ausgeschleust, das nun die Hülle des Helfers trägt.

Aus verschiedenen Tumoren konnten sowohl Helferviren als auch "in vitro" transformierende Retroviren isoliert werden. Das "simian sarcoma associated virus" (SSAV) z.B. wurde gemeinsam mit dem "simian sarcoma virus" (SSV) von einem spontanen Fibrosarkom eines Wollaffen isoliert. Dieser "simian sarcoma virus - simian sarcoma associated virus" Komplex (SSV(SSAV)Komplex) führt nach experimenteller Inokulation von Krallenäffchen, Hunden und Katzen zu soliden Tumoren. Er besteht aus zwei biologisch verschiedenen C-Typ Viren: Während das SSAV voll vermehrungsfähig ist, handelt es sich beim SSV um ein replikationsdefektes Agens. Dieses defekte Virus kann im Gegensatz zu SSAV Fibroblasten "in vitro" und "in vivo" transformieren und ist nur unter Mitwirkung von Helferviren zur Vermehrung fähig. Die Bildung von Tumoren durch den SSV(SSAV) Komplex ist allein auf das SSV zurückzuführen.

Für die Infektion mit SSV(SSAV) wurden bislang vorwiegend NRK-Zellen (NRK = normal rat kidney = Rattennierenzellen) verwendet (34, 35). Diese Rattenzellinie

enthält die genetische Information für ein endogenes C-Typ Retrovirus und bildet nicht infektiöse Viruspartikeln, die von der Zelle in den Gewebekulturüberstand abgegeben werden (34). Solche NRK- Zellen wurden mit dem Viruskomplex, bestehend aus dem "in vitro" transformierenden, replikationsdefekten "simian sarcoma virus" (SSV) und dem replikationskompetenten, "in vitro" nicht transformierenden Helfervirus "simian sarcoma associated virus" (SSAV), infiziert. Aus diesen Zellen wurden nach Aussaat in semisolidem Medium transformierte Klone isoliert, die nur das Genom des replikationsdefekten SSV enthielten und somit keine infektiösen Partikel in den Gewebekulturüberstand abgaben. Transformierte Zellen dieser Art bezeichnet man als SSV "non producer" (SSV-NP) Klone.

Werden empfängliche Zellen mit dem Helfervirus SSAV infiziert, so kommt es zu einem Abbau des "gag precursors" SSAV $pr65^{gag}$ in die Strukturproteine SSAV p15, SSAV p12, SSAV p30 und SSAV p10 (Abb.2a). Diese Spaltung erfolgt über mehrere Zwischenstufen, welche als SSAV p55, SSAV p40 und SSAV p25 bezeichnet wurden. Über die Reihenfolge der Entstehung der einzelnen Zwischenprodukte bei der Prozessierung von SSAV $pr65^{gag}$ in der Zelle liegen keine publizierten Daten vor. Es sind daher die unter Abb.2b aufgeführten Wege beim intrazellulären Abbau von SSAV $pr65^{gag}$ denkbar. Die einzelnen, bei der Spaltung von SSAV $pr65^{gag}$ auftretenden Zwischenprodukte setzen sich folgendermaßen zusammen: SSAV p55 besteht aus SSAV p30, SSAV p15 und SSAV p12, SSAV p40 aus SSAV p30 und SSAV p10, und SSAV p25 aus SSAV p15 und SSAV p12. Diese Bezeichnungen wurden analog auch für die Abbauprodukte des SSV p65 in vitro gewählt (s. Ergebnisse). Dabei muß darauf hingewiesen werden, daß diese Bezeichnungen nicht das aufgrund der SDS-PAGE errechnete Molekulargewicht der Moleküle angeben, sondern in Anlehnung an die für diese Genprodukte

allgemein übliche Nomenklatur gewählt wurden.

Wie Thiel et al. (34) zeigten, exprimiert der NRK SSV-NP Klon C2 ein etwa 65.000 Dalton (d) großes Molekül, das SSV p65. Ein Größenvergleich vom SSAV $pr65^{gag}$ mit dem SSV p65 mit Hilfe der SDS-PAGE ergab keinen Unterschied im Migrationsverhalten beider Moleküle. Auch mit Hilfe serologischer Methoden war es nicht möglich, die beiden Moleküle zu unterscheiden. Lediglich beim Abbau der Moleküle durch eine Protease (sog. "peptide maps") konnte ein kleiner Unterschied zwischen dem SSAV $pr65^{gag}$ und dem SSV p65 gefunden werden. Während SSAV $pr65^{gag}$ intrazellulär in die vier oben aufgeführten Strukturproteine gespalten wird, wird SSV p65 im Gegensatz dazu in der Zelle nicht prozessiert. Dies stellt einen bemerkenswerten Unterschied zwischen beiden Molekülen dar. Die Ursache dafür, daß SSV p65 nicht abgebaut wird, konnte (a) am Molekül selbst liegen (da z.B. aufgrund einer Strukturveränderung eine Spaltung nicht möglich war), oder (b) daran, daß eine für den Abbau notwendige Protease fehlte. Um abzuklären, welche dieser beiden Möglichkeiten in Frage kam, erfolgte eine Überinfektion des SSV-NP Klons C2 mit verschiedenen Helferviren. Damit sollte ein etwaiger Einfluß der verwendeten Retroviren bzw. deren Genprodukte auf das in der SSV-NP-Zelle nicht prozessierte SSV p65 untersucht werden.

Nach Überinfektion des NRK SSV-NP Klon C2 mit SSAV entstanden intrazellulär Moleküle, welche die Größe des SSAV $pr65^{gag}$ beziehungsweise des SSV p65 besaßen. Wie Thiel et al. (35) zeigten, werden diese Moleküle gespalten und es entstehen die oben genannten Zwischen- und Endprodukte. Es bestand jedoch die Schwierigkeit nachzuweisen, daß neben dem SSAV $pr65^{gag}$ auch SSV p65 exprimiert wird, da wie bereits ausgeführt, lediglich geringfügige Differenzen im Peptidmuster beider Moleküle bestehen. Daher überinfizierten Thiel et al. (35) die C2

Zellen mit einem heterologen Helfervirus, dem Mäuseleukämievirus FLV (= Friend Leukemia Virus). Dessen "gag precursor" und "gag"-Strukturproteine ließen sich sowohl aufgrund ihrer Größe in der SDS-PAGE, als auch serologisch eindeutig vom SSAV "gag precursor" und den SSAV "gag"-Strukturproteinen unterscheiden. Die mit FLV überinfizierten C2-Zellen bildeten FLV $pr65^{gag}$, dessen Spaltung zu den FLV "gag"-Strukturproteinen führte. Weiterhin konnte in diesen Zellen eindeutig die Expression von SSV p65 und seine Spaltung nachgewiesen werden; dabei enstand ein 30.000 d großes Molekül, welches sich vom SSAV p30 weder aufgrund seiner Größe in der SDS-PAGE, noch serologisch unterscheiden ließ. Dieses Abbauprodukt von SSV p65 wurde in Analogie zum homologen Helfervirus SSAV als SSV p30 bezeichnet. Dies könnte bedeuten, daß das Helfervirus FLV entweder für eine Protease kodiert oder eine zelluläre Protease aktiviert, welche sowohl das FLV $pr65^{gag}$, als auch SSV p65 korrekt abbaut.

Wie oben schon erwähnt, exprimiert der NRK SSV-NP Klon C2 neben dem SSV Genom auch das Genom eines endogenen Rattenretrovirus. Dieses endogene Virus ist offensichtlich nicht in der Lage, SSV p65 zu prozessieren. Bei der Reifung der endogenen Viruspartikel kommt es wahrscheinlich zum Einbau von SSV p65 in das endogene Rattenvirus. Mit Hilfe von gereinigtem, radioaktiv markiertem Virus aus dem NRK SSV-NP Klon C2 wurde gezeigt, daß in diesen nicht infektiösen Partikeln ungespaltenes SSV p65 vorhanden ist. Werden auf einer SDS-PAGE die Proteine solcher Partikel aufgetrennt, sind neben den Strukturproteinen des endogenen Virus (vor allem sein Hauptstrukturprotein p27) auch das ungespaltene SSV p65, aber keine Abbauprodukte von SSV p65 zu sehen. Die Produktion von solchen Viruspartikeln, in welchen SSV p65 nicht prozessiert vorliegt, eröffnete die Möglichkeit, SSV p65 stark anzureichern. Mit diesen

Viruspartikeln als Substratquelle konnte nun untersucht werden, ob das gereinigte Helfervirus FLV "in vitro" (d.h. im Reagenzglas) in der Lage ist, SSV p65 in die Zwischenprodukte SSV p55, SSV p40 und SSV p25 zu spalten und ob die Endprodukte SSV p15, SSV p12, SSV p30 und SSV p10 entstehen.

## 2. MATERIAL UND METHODEN

### 2.1 Reagenzien

- Natriumdodecylsulfat (SDS), Natriumdesoxycholat (DOC), Bromphenolblau, Urea, Tris, Triton X-100, Acrylamid, Glycin, N-N-N-N-Tetramethylendiamin (TEMED), Dithiothreitol (DTT), N, N'-Methylen-bisacrylamid, Ethylendiamintetraessigsäure-Na-Salz (EDTA), Rinderserumalbumin (BSA), N-Ethylmaleimid (NEM), N-Morpholinoäthansulfonsäure (MES), p-Chloromercuribenzoesäure (PCMB), alle von Serva Heidelberg
- Glycerol, Phenolrot, Methanol, Essigsäure, Natrium-carbonat, Kalium-Natriumtartrat, Natriumhydroxid, Kupfer-II-sulfat-5-hydrat, 2-Mercaptoäthanol, Folin-Ciocalteus Phenolreagenz, Dimethylsulfoxid, alle von Merck Darmstadt
- Jodacetamid, L-1-chlor-3-4-tosylamido-7-amido-2-heptanon (TLCK), L-1-chlor-3-4-tosylamido-4-phenyl-2-butanon (TPCK), Phenylmethansulfonyl-fluorid (PMSF), Parachloromercuribenzoesäure (PCMB), N-N'-bis 2-ethane-sulfonic acid (Pipes), 2,5-Diphenyloxazole (PPO), alle von Sigma München
- radioaktive Aminosäuren: $^{3}$H-Leucin, $^{3}$H-Prolin, $^{3}$H-Myristylsäure, $^{35}$S-Cystein, $^{14}$C radioaktiv markierte Markerproteine, alle von Amersham Buchler Braunschweig
- Kälberserum (fötal), Gibco, Glasgow Schottland
- Trypsin ICN National Biochemicals Cleveland, Ohio
- Substanzen für die Gewebekultur Grand Island Biological Company (Gibco), Buffalo, USA
- KODAC X-Omat AR X-RAY Film
- Filmentwickler und Fixierer, Tetanol Photowerk Hamburg-Berlin
- alle weiteren Substanzen ohne nähere Angaben waren von
  Merck Darmstadt

Serva Heidelberg
Sigma München

## 2.2 Lösungen und Puffer

- DMEM (Dulbecco's modifiziertes Medium nach Eagle) Gibco, Buffalo, USA
- PBS (phosphate buffered saline) 0.8 gr NaCl, 0.2 gr KCl, 0.1 gr $CaCl_2$ x 2 $H_2O$, 1.15 gr $NaHPO_4$ x 2 $H_2O$, 0.2 gr $KH_2PO_4$ x 2 $H_2O$, 0.1 gr MgCl x 6 $H_2O$ gelöst in 1000 ml Bidest
- Pipes: Stammlösung 0.2 M in Bidest, pH 6.9
- MES: Stammlösung 1 M in Bidest, pH 5.5 und 6.0
- Ammoniumpersulfat (APS): 10 mg/ml frisch angesetzt
- Elektrodenlaufpuffer für SDS-PAGE (Stammlösung 8 x konzentriert): 0.2 M Tris-HCl, 0.8% SDS, 1.54 M Glycin, pH 8.3
- Sammelgelpuffer: 2 x konzentriert, 0.25 M Tris-HCl, pH 6.8
- Trenngelpuffer: 2 x konzentriert, 0.75 M Tris-HCl, pH 8.8
- Probenpuffer: 2% SDS, 0.0625 M Tris, 10% Glycerol, 6 M Urea, 5% Mercaptoäthanol, 0.01% Bromphenolblau, 0.01% Phenolrot
- Gellösungen: 7.5% Gel: 7.5% Acryl-Bisacrylamid-lösung (30:1), 0.26% SDS, 0.03% APS, 0.06% TEMED, 5% Glycerol in 0.37 M Tris-HCl Puffer pH 8.8
  20% Gel: 20% Acryl-Bisacrylamidgellösung (30:1), 0.26% SDS, 0.03 APS, 0.06% TEMED, 5% Glycerol in 0.37 M Tris-HCl Puffer pH 8.8
- Sammelgellösung: 4% Acryl-Bisacrylamidlösung (30:1), 0.06% SDS, 0.015% APS, 0.125 M Tris-HCl Puffer pH 6.8
- Gelüberschichtungslösung: 100 ml Gel-Puffer pH 8.8, 125 ml Bidest, 5 ml 10% SDS., 0.5 ml TEMED
- Gel Fixierlösung: 30% Methanol, 10% Essigsäure, 0.25 gr Coomassie blue, 40% Bidest

- Entfärbelösung: 5% Methanol, 7% Essigsäure, 88% Bidest
- Lösung zur Gelfluorographie: 22.2 gr PPO in 1l DMSO gelöst
- Lowry-Lösungen:
  A. 2% $Na_2CO_3$, 0.02% Na-K-tartrat in 0.1 N NaOH
  B. 0.5% $CuSO_4 \times 5\ H_2O$
  C. Folin-Ciocalteus Phenolreagenz, bei Gebrauch 1:1 verdünnt

## 2.3 Geräte und Laborhilfsmittel

- Reagiergefäße: Sarsted
- Gewebekulturschalen: Becton und Dickinson
- Sonstiges Plastikzubehör: Nunc und Falcon
- Elektrophoreseausrüstung: Höfer Scientific Instruments San Franzisco, USA
- Ultrazentrifuge: Beckman L3-50 mit den Rotoren R 50.2 Ti, R 40 und R 21
- Laborzentrifugen: Heraeus Christ Minifuge
- Wasserbäder: Kästner analytec
- Brutschränke: Fa. Bergmann Berlin
- $CO_2$ Kontrollgeräte: CH/P Forma Scientific
- Ultraschallgerät: Branson Sonifier B-12
- Szintillationszähler: bF betaszint BF 8000 Fa. Berthold
- Spektralphotometer: Zeiss
- Durchlichtmikroskop: Leitz Diavert
- Elektronenmikroskop: EM 10
- Schlauchpumpe: Abimed Düsseldorf
- Spannungsgerät: "Quickfit" Instruments England

## 2.4 Zellen

- Normale Rattennierenzellen (NRK Zellen)
- SSV transformierte "non producer" NRK Zellen (NRK SSV-NP)

- mit SSAV infizierte NRK Zellen (NRK SSAV)

Sämtliche Zellen wurden in Dulbecco's modifiziertem Eagle's Medium mit 10% fötalem Kälberserum (FKS) gehalten.

## 2.5 Viren

- Simian Sarcoma Associated Virus (SSAV), 1971 von Theilen et al. (33) zusammen mit SSV aus einem spontanen Fibrosarcom eines Wollaffen isoliert.
- Simian Sarcoma Virus (SSV), 1971 zusammen mit SSAV isoliert.
- Friend Leukämie Virus (FLV), 1957 von C. Friend isoliert (12, 27).

## 2.6 Markierung von Viren mit radioaktivem $^{3}$H-Leucin, $^{35}$S-Cystein, $^{3}$H-Prolin und $^{3}$H-Myristylsäure

Virus produzierende Zellen wurden in einer Konzentration von $5x10^{5}$ Zellen/ml eingesät. Die zur Markierung der viralen Proteine eingesetzte Menge an Radioaktivität betrug 100 µCi/ml $^{3}$H-Leucin ($^{35}$S-Cystein, $^{3}$H-Prolin, $^{3}$H-myristic acid). Das bei der Markierung verwendete Medium enthielt kein Leucin (bez. Cystein, Prolin). Die Markierung erfolgte ca. 15 Stunden nach dem Einsäen der Zellen über einen Zeitraum von 24h ("pulse"). Danach wurde der Gewebekulturüberstand abgenommen und durch frisches Medium ersetzt ("chase"), welches nach 24h ebenfalls abgenommen und wie der Gewebekulturüberstand nach dem "pulse" zur Viruspartikelreinigung verwendet wurde.

## 2.7 Viruspartikelreinigung

Im ersten Reinigungsschritt wurde Gewebekulturüberstand

von NRK SSV-NP Klon C2 Zellen bei 8000 rpm für 15 Minuten zentrifugiert. Dabei pelletierten im Überstand enthaltene Zellen, Zelltrümmer und andere größere zelluläre Bestandteile, wie etwa Zellkerne. Nach der Zentrifugation wurde der Überstand abgenommen, mit 10% Sucrose unterschichtet und anschließend in einem pI 10 Lauf pelletiert. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet in PBS resuspendiert und in einem erneuten pI 10 Lauf pelletiert. Der Überstand wurde erneut verworfen, während das Pellet im entsprechenden Spaltungspuffer aufgenommen wurde.

## 2.8 Bestimmung der Radioaktivität der gereinigten Viruspartikel

Fünf Mikroliter des unter 2.7 in Spaltungspuffer aufgenommenen Viruspellets wurden in fünfzig Mikrolitern Bidest resuspendiert, mit 2,5 ml Szintillationsflüssigkeit gut vermischt und anschließend ausgezählt. Anhand der in den Proben enthaltenen Radioaktivität wurden die Viruspartikel verdünnt, sodaß ca. 30.000 cpm in fünf Mikrolitern enthalten waren.

## 2.9 "in vitro" Spaltung

Ein "in vitro" Versuchsansatz zur Spaltung von SSV p65 setzte sich unter optimierten Bedingungen aus dem Spaltungspuffer (70 mM Endkonzentration), 1% NP 40 (Vol/Vol), 10 mM DTT, ca. 10 mg/ml FLV Extrakt und dem radioaktiv markierten Substrat (ca. 60.000 cpm) zusammen. Das Endvolumen des Versuchsansatzes betrug 30 µl. Der gesamte Versuchsansatz wurde in einem Wasserbad für fünf Minuten auf 56$^{o}$C erhitzt, auf Eis abgekühlt, in einem Eiswasserbad 3x10 sec. beschallt und anschließend bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Beendigung der Inkubation wurden die einzelnen Versuchsansätze durch Zugabe von 2 x konzentriertem Probenpuffer gestoppt.

## 2.10 Inhibition der "in vitro" Spaltung von SSV p65 durch FLV

Abweichend von dem unter 2.9 genannten Versuchsansatz wurden bei den Inhibitionsversuchen in DMSO gelöste Inhibitoren in unterschiedlichen Konzentrationen den einzelnen Proben zugefügt. Je nach Fragestellung wurde der Inhibitor mit dem zuvor erhitzten und auf Eis abgekühlten FLV Extrakt ohne Substrat 1.5h bei Raumtemperatur vorinkubiert, oder während der Inkubation zugefügt. Parallel dazu wurde jeweils eine Kontrollprobe ohne Inhibitor, aber mit DMSO inkubiert.

## 2.11 Vorbereitung der Proben für die Analyse

Die Analyse der Versuchsansätze der "in vitro" Spaltung wurde mit Hilfe der SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) vorgenommen. Hierzu wurden die mit dem Probenpuffer versetzten Reaktionsansätze für drei Minuten auf 95$^{o}$C erhitzt, kurz zentrifugiert und anschließend auf das Gel aufgetragen.

## 2.12 Natriumdodecylsulfat Polyacrylamid Gelektrophorese der viralen Proteine

Für die Analyse der im Versuchsansatz enthaltenen viralen Proteine wurden 7.5%-20% Gradientengele im diskontinuierlichen System nach Laemmli (20) benutzt. Diese SDS-PAGE besaß den Vorteil, sowohl im nieder-, als auch im hochmolekularen Bereich Moleküle mit geringen Größenunterschieden gut aufzutrennen. Der Gradient wurde aus einer 7.5% Acryl-Bisacrylamidlösung und einer zweiten Lösung aus 20% Acryl-Bisacrylamid gegossen. Die eisgekühlte Lösung wurde unter kontinuierlichem mischen von unten zwischen die Glasplatten gepumpt. Auf den Gradienten wurde nach dessen Polymerisation eine Sammelgellösung pippetiert. Auf das polymerisierte

Sammelgel wurde anschließend die wie unter 2.11 behandelten Proben aufgetragen. Der Lauf erfolgte bei 6.25 Volt pro cm durch das Sammelgel und bei 9.37 Volt durch das Trenngel.

## 2.13 Fixierung, Färbung und Entfärbung der SDS-PAGE

Die für die Fluorographie bestimmten Gele wurden für mindestens eine Stunde mit einer Fixierlösung behandelt. Anschließend wurden die Gele für mindestens eine Stunde gewässert (häufiger Wechsel des Wassers). Gele, bei denen die Proteine angefärbt werden sollten, wurden eine Stunde lang in eine Färbelösung gelegt und danach mit einer Entfärbelösung entfärbt.

## 2.14 Vorbereitung der SDS-PAGE für die Fluorographie

Zur Vorbereitung der SDS-Polyacrylamidgele für die Fluorographie wurden die Gele nach dem Fixieren für 2h mit Dimethylsulfoxid (DMSO) entwässert und danach für drei weitere Stunden in einem Gemisch aus DMSO und PPO inkubiert. Das in das Gel eindiffundierte PPO wurde durch längeres Wässern des Geles ausgefällt und das DMSO durch mehrfachen Wasserwechsel entfernt (5).

## 2.15 Fluorographie der SDS-PAGE

Die so fixierten und imprägnierten Gele wurden auf einer Trocknungsanlage bei 90°C unter Vakuum auf Filterpapier getrocknet und in einer Kassette mit einem Kodak X-Omat AR Film exponiert. Die belichteten Filme wurden mit der unter Material und Methoden angeführten Entwicklerflüssigkeit fünf Minuten lang entwickelt, dann fixiert, gewässert und anschließend getrocknet.

## 2.16 Proteinbestimmung nach Lowry

Proteinbestimmungen wurden nach der von Lowry et al. (22) beschriebenen Methode durchgeführt.

# 3. ERGEBNISSE

## 3.1 "in vitro" Spaltung von SSV p65 durch FLV

Zur Untersuchung der "in vitro" Spaltung von SSV p65 durch FLV mußte zuerst ein "in vitro" System etabliert werden, mit dessen Hilfe sich eine etwaige, im Helfervirus vorhandene enzymatische Aktivität nachweisen ließ. Hierzu wurden für die Vorversuche verschiedene Testansätze gewählt, welche in der Literatur für Proteasen mit ähnlicher Funktion in anderen Retrovirussystemen schon beschrieben worden sind (9, 14, 17, 23, 37, 38, 41). Anhand der dabei erzielten Ergebnisse fiel die Entscheidung auf eine Versuchsanordnung, mit welcher sich eine proteolytische Aktivität eindeutig nachweisen ließ. Durch systematische Veränderung der einzelnen Parameter sollten dann optimierte "in vitro" Bedingungen für das SSV System etabliert werden.

### 3.1.1 Ausgangsbedingungen

Der in der Einleitung angeführte NRK SSV-NP Klon C2 wurde mit der radioaktiv markierten Aminosäure $^{3}$H-Leucin inkubiert und das in den Gewebekulturüberstand abgegebene radioaktiv markierte Virus (im folgenden als C2-Partikel bezeichnet) geerntet; dieses enthält, wie schon erwähnt, ungespaltenes SSV p65. Nach zweimaligem Pelletieren durch Sucrose und anschließender Aufnahme in Pipes-Puffer (pH 6.9) bildeten diese Viruspartikel das Substrat für die folgenden Versuche. Als Enzymquelle diente FLV, welches nach Pelletierung durch einen Sucrose-Dichtegradienten gereinigt worden war.

Für die ersten Versuche wurde folgender Ansatz gewählt:

a) Puffer: Pipes; dieser weist seine beste Pufferkapazität bei pH 6.9 auf (siehe auch 3.1.4).

b) Nichtionisches Detergens: NP 40; damit sollte die Lipidhülle des Virus zerstört werden (siehe auch 3.1.3).

c) Reduktionsmittel: DTT; um eventuell vorhandene Disulfidbrücken zu reduzieren (siehe auch 3.1.5).

d) Dimethylsulfoxid (DMSO): als organisches Lösungsmittel für Inhibitoren im Hinblick auf später durchzuführende Inhibitonsversuche (siehe auch 3.2.4).

e) Beschallung: Der gesamte Versuchsansatz wurde vor der Inkubation 3x10 sec. im Eiswasserbad mit Ultraschall behandelt, um die durch das Detergens bewirkte Auflösung des Virus zu verstärken.

f) Zeitraum: Die Inkubationszeiten des Reaktionsgemisches betrugen zwischen 1h und 27h.

g) Temperatur: Die Inkubationstemperatur lag bei 24°C (siehe auch 3.1.6).

Unter diesen Bedingungen wurden radioaktiv markierte C2-Partikel mit FLV inkubiert. Um festzustellen, ob im Vergleich zum Ausgangsmaterial neu entstehende Banden auf eine enzymatische Tätigkeit zurückgeführt werden konnten, ist eine Zeitkinetik angefertigt worden. Als Kontrolle wurde ein Versuchsansatz nach der Ultraschallbehandlung gestoppt (Abb.3, Spur 1). Diese Probe diente als Ausgangsmaterial zum Zeitpunkt Oh, da hier noch kein

enzymatischer Abbau von SSV p65 stattgefunden haben dürfte. Dies war notwendig, um das Proteinmuster der nachfolgenden Proben mit dem des Ausgangsmateriales vergleichen zu können. In diesem Startmaterial sollte neben den Proteinbanden des endogenen Virus (vor allem sein p27) auch ungespaltenes SSV p65, jedoch keine Zwischenprodukte (SSV p55, SSV p40, SSV p25) und Endprodukte (SSV p15, SSV p12, SSV p30, SSV p10) zu sehen sein. Die einzelnen Zeitpunkte der Kinetik waren 1h, 3h, 9h und 27h, wobei die Proben jeweils durch Zugabe von Probenpuffer für die SDS-PAGE (siehe Material und Methoden) gestoppt wurden.

Um eine etwaige unspezifische Spaltung nachweisen zu können, wurde zusätzlich eine Probe ohne FLV unter ansonsten gleichen Bedingungen für 27h inkubiert (Abb.3, Spur 2). Aus Abbildung 3 ist zu ersehen, daß es nach Inkubation des SSV p65 mit FLV (Spuren 3-6) zur Bildung von drei neuen Proteinbanden kommt (siehe Pfeile Abb.3). In der Kontrolle in Spur 2 treten diese neuen Proteinbanden nicht auf. In Spur 7 ist als weitere Kontrolle ein Immunpräzipitat bestehend aus SSAV p30 und NRK p27 aufgetragen. Bei der oberen Bande handelt es sich um SSAV p30, bei der darunter um NRK p27. Diese SSAV p30 Bande komigriert mit einer der drei in der Kinetik neu entstehenden Banden (Pfeil 2), welche deshalb die Bezeichnung SSV p30 bekam. Die beiden übrigen, neu entstehenden Moleküle wurden unter Bezug auf die Einleitung als Zwischenprodukte SSV p55 (Pfeil 1) und SSV p40 bezeichnet (Pfeil 3). Während SSV p55 und SSV p40 im Verlauf der Kinetik zuerst an Intensität zu- (Spuren 3,4) und dann abnehmen (Spuren 5,6), nimmt die Proteinbande in Höhe von 30.000 Dalton kontinuierlich an Intensität zu. Im Vergleich mit den Proteinbanden in den Spuren 1 und 2 sind die Proteinbanden der Spuren 3-6 leicht nach unten versetzt. Dies ist auf die relativ große Menge an nicht radioaktiv markierten Proteinen

(ca. 10mg/ml) des zusätzlich aufgetragenen FLV zurückzuführen, welche die Proteine des endogenen NRK-Virus (insbesondere NRK p27) und die des SSV p65 und seiner Spaltprodukte (insbesondere SSV p30) nach unten drücken.

Damit war gezeigt, daß mit FLV eine enzymatische Aktivität assoziiert ist, welche SSV p65 in einer Weise spaltet, daß neben anderen ein ca. 30.000 Dalton großes Molekül entsteht (SSV p30), welches mit SSAV p30 komigriert.

### 3.1.2 Verschiedene Behandlungen des Testansatzes

Aus dem unter 3.1.1 beschriebenen Experiment ergab sich ein wichtiges Ergebnis: Unter den gewählten Bedingungen wurde SSV p65 eindeutig prozessiert, aber die Effizienz der Spaltung war noch recht gering. Unter optimalen Bedingungen würde man nach einer Inkubationszeit von 27h einen vollständigen Abbau von SSV p65 erwarten. Zu diesem Zeitpunkt ist SSV p65 jedoch nur teilweise prozessiert worden (s. Abb.3, Spur 6). Die Ursache hierfür könnte trotz Detergens und Ultraschallbehandlung in einer unzureichenden Zugänglichkeit von Enzym und/oder Substrat liegen. So ist denkbar, daß das Enzym im "core" des Virus (dem vorwiegend aus Proteinen zusammengesetzten inneren Teil des Virus), welches sehr stabil ist, vorliegt. Es ist weiterhin möglich, daß das Substrat SSV p65 zum Teil in das "core" der endogenen Viruspartikel eingebaut wird. Weitere Vorversuche ergaben, daß die im Testansatz eingesetzte Menge an Detergens im Zusammenwirken mit Ultraschall nicht ausreichend war, Viruspartikel und virale "cores" vollständig zu zerstören (Ergebnisse dieser elektronenmikroskopischen Untersuchungen nicht gezeigt). Es wurde daher nach einer Methode gesucht, Enzym und Substrat besser zugänglich zu machen, ohne diese dabei zu beein-

trächtigen. In diesem Zusammenhang boten sich Experimente an, bei denen eine kurzfristige Erhitzung von Enzymquelle und/oder Substrat erfolgte.

Hierfür wurden folgende Versuchsansätze gewählt:

1. Der gesamte Testansatz, mit Ausnahme des FLV-Extraktes, wurde für fünf Minuten auf 56°C erhitzt und danach im Eiswasserbad abgekühlt. Anschließend ist FLV als Enzymquelle hinzugefügt, die gesamte Probe im Eiswasserbad mit Ultraschall behandelt und für 12 Stunden inkubiert worden.

2. Bei dieser Probe wurde lediglich die Enzymquelle FLV auf 56°C für fünf Minuten erhitzt. Nach dem Abkühlen erfolgte die Zugabe des Substrates, die Behandlung mit Ultraschall und die Inkubation für 12 Stunden.

3. Hier wurde sowohl das Substrat als auch das Enzym auf 56°C erhitzt, die anschließende Behandlung erfolgte wie unter 1 und 2.

4. Als Kontrolle kam eine Probe entsprechend den unter 3.1.1 aufgeführten Bedingungen hinzu.

Das Ergebnis dieses Versuches ist in Abbildung 4 dargestellt. In Spur 1 sind als Startmaterial radioaktiv markierte Partikel aufgetragen, in Spur 2 die unter den zunächst ausgearbeiteten Bedingungen (s.o. Versuchsansatz 4) angesetzte Probe. In Spur 6 wurde als Kontrolle Ausgangsmaterial, welches ohne FLV unter den gleichen Bedingungen wie die Probe in Spur 5 (s.o. Versuchsansatz 3) inkubiert wurde, aufgetragen. Das Bandenmuster dieser Kontrolle ist mit dem des Startmaterials identisch. Bei der alleinigen Erhitzung der Enzymquelle (s.o. Versuchsansatz 2) kommt es im

Vergleich mit der Probe in Spur 2 zu keiner nennenswerten Verbesserung des Abbaues von SSV p65. Bei beiden Proben ist deutlich das Entstehen von SSV p40 (Pfeil 4) und als neu auftretendes Zwischenprodukt (siehe Einleitung) eine schwache SSV p25 Bande (Pfeil 3) zu sehen; auch SSV p30 (Pfeil 2) wird eindeutig gebildet. Ein etwas anderes Proteinbandenmuster erhält man nach Erhitzung des Substrates (Spur 4, s.o. Versuchsansatz 1). Hier kommt zu den bereits in den Spuren 2 und 3 nachgewiesenen Proteinen SSV p40, SSV p25 und SSV p30 eine neue Bande, nämlich SSV p55 (Pfeil 1), hinzu. Der Anteil an ungespaltenem SSV p65 dürfte aufgrund der Intensität der SSV p65 Bande im Vergleich mit der in Spur 3 etwa gleich sein. Zu einem erheblich stärkeren Abbau von SSV p65 kommt es, wenn sowohl Enzymquelle als auch Substrat kurzzeitig erhitzt wurden (Spur 5; s.o. Versuchsansatz 3). Das SSV p65 ist hier im Vergleich zum Ausgangsmaterial größtenteils abgebaut worden. Es sind starke SSV p55 und SSV p30 Banden zu sehen. Die SSV p40 Bande ist im Vergleich mit der in den Spuren 2-4 schwächer, während die SSV p25 Bande deutlich an Intensität zugenommen hat. Daß es sich bei diesen neu entstandenen Molekülen nicht um unspezifisch entstandene Abbauprodukte handelt, geht aus einem Vergleich des Proteinbandenmusters in Spur 5 mit dem in Spur 6 hervor; in dieser Kontrolle ist keines der vier genannten Proteine nachweisbar.

Diese Versuche ließen zwei Schlußfolgerungen zu:

a) Substrat und Enzym werden durch diese kurzfristige Erhitzung offensichtlich nicht beeinträchtigt.

b) Für eine bessere Spaltung von SSV p65 sollten sowohl Substrat als auch Enzym erhitzt werden.

Bei allen weiteren Versuchen wurden daher die Versuchsansätze für fünf Minuten auf 56°C erhitzt.

### 3.1.3 Detergenskonzentration

Eine weitere Möglichkeit, die Zugänglichkeit von Substrat und Enzym zu erhöhen, bestand in der Veränderung der Konzentration des nicht ionischen Detergens. Damit sollte zum einen ermittelt werden, ob Detergens überhaupt notwendig war und zum anderen, welche Effekte die Erhöhung oder Reduktion der ursprünglich eingesetzten Menge von NP 40 haben. Hierzu wurden Konzentrationen des nicht ionischen Detergens NP 40 zwischen 0.1% und 2% eingesetzt (Abb. 5). Hinzu kamen noch zwei Proben ohne Detergens, eine davon mit, die andere ohne Ultraschallbehandlung. Dabei ergaben sich folgende Resultate (Abb. 4):

1. Bei den Proben, welche kein NP 40 im Versuchsansatz enthielten (Spuren 6,7) kommt es zu einem teilweisen Abbau von SSV p65. Im Gegensatz zum Startmaterial (Spur 1) ist deutlich das Zwischenprodukt SSV p55 zu sehen, ebenso SSV p30 und eine schwache SSV p25 Bande. Die Behandlung der Probe mit Ultraschall (Spur 6) ergab keine Verbesserung des Abbaues von SSV p65 im Vergleich mit derjenigen ohne Ultraschallbehandlung (Spur 7).

2. Eine Detergenskonzentration von 0,1% NP 40 ist ausreichend, um einen vollständigen Abbau von SSV p65 zu erhalten (Spur 5). Bei 0,3% NP 40 (Spur 4) und 0,5% NP 40 (Spur 3) kommt es wie bei 1% NP 40 (Spur 2) zu einem vollständigen Abbau von SSV p65, es entstehen deutlich sichtbar SSV p55, SSV p30 und SSV p25. Im Vergleich zu 1% NP 40 (Spur 2) ist nur die SSV p55 Bande bei 0,1% NP 40 etwas intensiver.

3. Beim Einsatz von 2% NP 40 (Spur 8) kommt es zu keiner Verbesserung der Spaltung von SSV p65 im Vergleich mit der Probe, welche 1% NP 40 enthielt. Die enzymatische Aktivität wird bei dieser Konzentration jedoch auch nicht negativ beeinflußt. Höhere Konzentrationen von nicht ionischem Detergens beeinträchtigen die elektrophoretische Auftrennung von Molekülen, die kleiner als 20.000 Dalton sind. Daher wurde auf den Einsatz von Detergenskonzentrationen größer als 2% verzichtet.

Bei allen weiteren Versuchen wurde eine Detergenskonzentration von 1% NP 40 eingesetzt.

### 3.1.4 pH-Optimum

Nachdem die Frage nach einer besseren Zugänglichkeit von Enzym und Substrat abgeklärt war, interessierte der für die enzymatische Aktivität optimale pH-Wert. Dazu wurden pH-Werte zwischen pH 5.5 und pH 7.5 in Abständen von jeweils 0.5 Einheiten ausgewählt. Dies geschah, um einerseits eine möglichst weite und trotzdem biologisch sinnvolle pH-Spanne abzudecken und andererseits eine relativ genaue Eingrenzung des optimalen pH-Wertes zu erreichen. Hierfür wurden zwei verschiedene Puffer (Pipes, MES) gewählt. Der $pK_a$-Wert des einen Puffer lag bei pH 6.1 (MES), der des anderen (Pipes) bei pH 6.9. Mit der Wahl dieser beiden Puffer sollte eine gute Pufferwirkung innerhalb des erwähnten pH-Bereiches gewährleistet und damit unspezifische Effekte durch ungenügende Pufferung ausgeschlossen werden. Bei pH 5.5 ist keine Spaltung von SSV p65 zu sehen (Abb.6, Spur 2). Bei pH 6.0 treten eine schwache SSV p55- und SSV p30-Bande, aber kein SSV p25 (Spur 3) auf. Zu einer deutlichen, wenn auch nicht vollständigen Prozessierung von SSV p65 kommt es bei pH 6.5, sowohl bei der Probe mit MES-Puffer (Spur 4), als auch bei der mit Pipes

(Spur 5). Hier sind neben der deutlichen SSV p55 Bande auch gut SSV p30 und SSV p25 zu erkennen. Dies zeigte, daß die beiden unterschiedlichen Puffersubstanzen unter ansonsten gleichen Bedingungen keinen Einfluß auf die Spaltung von SSV p65 hatten. Einen vollständigen Abbau von SSV p65 ergab die Inkubation der Probe bei pH 7.0 (Spur 6). SSV p65 ist vollständig gespalten und es ist nur sehr wenig SSV p55 zu sehen. SSV p30 ist deutlich zu erkennen, ebenfalls SSV p25. Die Inkubation bei pH 7.5 (Spur 7) ergab zwar einen vollständigen Abbau von SSV p65, doch ist hier die SSV p55 Bande wieder etwas intensiver im Vergleich zur Probe mit pH 7.0 in Spur 6. Daraus ergab sich, daß der für die "in vitro" Spaltung am geeignetste pH bei 7.0 liegt.

### 3.1.5 DTT-Abhängigkeit

Von verschiedenen zellulären Enzymen ist bekannt, daß sie für ihre Funktionsfähigkeit ein reduzierendes Agens benötigen (40). Solche Reduktionsmittel, in der Zelle das Glutathion, reduzieren intramolekular vorhandene Disulfidbrückenbindungen zu Thiolgruppen und ermöglichen so erst die proteolytische Aktivität bestimmter Enzyme. Da nicht bekannt war, ob die im FLV-Extrakt enthaltene Protease ein Reduktionsmittel benötigt, wurden Proben unter vorher ausgetesten Bedingungen ohne DTT und mit DTT-Konzentrationen zwischen 1 mM und 100 mM inkubiert.

Inkubierte man einen Versuchsansatz unter ansonsten optimierten Bedingungen, jedoch ohne DTT, so kam es zu keinem nennenswerten Abbau von SSV p65 (Abb.7, Spur 7). Es ist nur eine sehr schwache SSV p55 Bande zu sehen. Sehr ähnlich verhält es sich bei der Probe mit 1 mM DDT (Spur 2). Bei 5 mM DTT Endkonzentration kommt es hingegen zu einem fast vollständigen Abbau von SSV p65 (Spur 3). SSV p55 ist gut sichtbar, SSV p30 und SSV p25 sind sehr deutlich nachweisbar. Bei 10 mM DTT (Spur 4) und 50

mM DTT (Spur 5) wird SSV p65 komplett gespalten, SSV p55 ist im Vergleich zur Probe mit 5 mM DTT (Spur 3) schwächer ausgeprägt. Bei 100 mM DTT wird SSV p65 nicht vollständig abgebaut und SSV p55 wird angereichert, doch kommt es auch hier zu einer deutlichen Bildung von SSV p30 und SSV p25 (Spur 6). Aus diesem Versuch geht hervor, daß ein reduzierendes Agens für eine optimale Prozessierung von SSV p65 notwendig ist, wobei sich eine Konzentration von 10 mM DTT als ausreichend erwies. Die relativ hohe DTT-Konzentration von 100 mM hingegen führte zu einer leichten Abnahme der enzymatischen Aktivität.

### 3.1.6. Inkubationstemperatur

Wie bei anderen chemischen Prozessen erhöht sich die Umsatzrate einer durch Enzyme katalysierten Reaktion bei ansteigender Temperatur. Dies gilt jedoch nur für den Temperaturbereich, in welchem das Enzym stabil ist und seine volle biologische Aktivität beibehält. Für die meisten enzymatischen Reaktionen gilt annähernd, daß sich bei einer Temperaturerhöhung von 10°C die Reaktionsgeschwindigkeit verdoppelt, was man als einen $Q_{10}$ von ungefähr 2 bezeichnet. Enzymatische Reaktionen zeigen häufig ein Temperaturoptimum, innerhalb dessen die katalytische Aktivität am höchsten ist. Bei weiter ansteigenden Temperaturen nimmt diese aufgrund von Hitzedenaturierung des Enzyms wieder ab. Die Temperaturoptima verschiedener Enzyme sind oft unterschiedlich und müssen nicht mit der in der natürlichen Umgebung des Proteines angetroffenen Temperatur übereinstimmen (21).

Es sollte daher geprüft werden, welche Inkubationstemperatur sich für den "in vitro"-Spaltungsvorgang von SSV p65 am ehesten eignete. Hierzu wurden vier verschiedene Temperaturen gewählt und zwar 4°C, 24°C, 37°C und 56°C. Dabei ist bei jedem Ansatz eine Probe unter

ansonsten gleichen Bedingungen ohne FLV inkubiert worden, um unspezifisch auftretende neue Proteinbanden bei den einzelnen Inkubationstemperaturen nachweisen zu können. Wie aus Abb.8a ersichtlich ist, kam es bei 4°C (Spur 2) zu einem geringfügigen Abbau von SSV p65, verbunden mit dem Auftreten des Zwischenproduktes SSV p55; es werden weder SSV p30 noch SSV p25 gebildet. Ähnlich verhält es sich bei der Inkubationstemperatur von 37°C (Abb.8b, Spur 2). SSV p65 wird prozessiert, es ist SSV p40 zu sehen, jedoch wenig oder kein SSV p30. Die SSV p25 Bande weist eine sehr geringe Intensität auf.

Da diese Temperatur am ehesten derjenigen im natürlichen Wirt für diese Viren entsprach, war dieses Ergebnis überraschend. Eine mögliche Ursache für den relativ schwachen Abbau von SSV p65 bei 37°C kann in der starken Aggregatbildung liegen, welche unter den gewählten Bedingungen bei 37°C auftrat. Hierbei kommt es offensichtlich zur Zusammenlagerung verschiedener Moleküle zu großen Komplexen, welche selbst bei der Auftrennung in der SDS-PAGE nur wenige Millimeter in das Trenngel eindringen (Abb.8b, Spur 2 oberhalb des Proteinstandards für 200K). In diesen Aggregaten könnte auch die im FLV enthaltene Protease eingeschlossen sein, wodurch der Nachweis ihrer enzymatischen Aktivität eventuell nicht mehr möglich ist. Die Inkubation bei 56°C (Abb.8b, Spur 3) ergab im Vergleich mit Spur 2 eine noch stärker ausgeprägte Reduktion sämtlicher Proteinbanden durch die erwähnte Aggregatbildung; daher erlaubt dieser Versuchsansatz keine Aussage darüber, ob bei dieser Temperatur ein spezifischer Abbau von SSV p65 möglich ist. Überraschenderweise erwies sich die ursprünglich gewählte Inkubationstemperatur von 24°C für die "in vitro" Spaltung von SSV p65 am geeignetsten (Abb.8a, Spur 4). SSV p65 wird deutlich abgebaut, es wird SSV p55, SSV p30 und SSV p25 gebildet. In allen Kontrollproben, welche

ohne FLV inkubiert worden waren (Abb.8a, Spuren 3,5 und Abb.8b, Spuren 1 und 4), kam es im Vergleich zum Ausgangsmaterial (Abb.8a, Spur 1) zu keiner Veränderung des Proteinbandenmusters. Eine Ausnahme bildete die Kontrolle bei 56°C (Abb.8b, Spur 4). Hier kam es ebenso wie im Versuchsansatz mit FLV (Abb.8b, Spur 3) zu einer starken Aggregatbildung. Für alle weiteren Versuche wurde daher eine Inkubationstemperatur von 24°C gewählt.

### 3.1.7 Spaltung unter optimierten Bedingungen

Die Auswirkungen der gegenüber den Ausgangsbedingungen veränderten Parameter sind in Abb.9 dargestellt. Hier wurde die "in vitro" Spaltung von SSV p65 mit Hilfe von FLV-Extrakt unter optimierten Bedingungen (ausgearbeitet unter 3.1.2-3.1.6) durchgeführt. Die Dauer der Inkubation betrug 24h. Spur 1 stellt das Ausgangsmaterial dar, Spur 2 die Probe nach der Spaltung von SSV p65 durch die im FLV enthaltene enzymatische Aktivität, Spur 3 die Kontrolle ohne FLV. SSV p65 ist in Spur 2 fast vollständig abgebaut, sowohl das Zwischenprodukt SSV p55, als auch SSV p25 sind deutlich sichtbar. Besonders stark ausgeprägt ist die SSV p30 Bande. Der Kontrollversuchsansatz ohne FLV weist keine dieser Proteinbanden auf (Abb.9, Spur 3). Bei allen weiteren Versuchen wurde daher unter den beschriebenen optimierten Bedingungen gearbeitet.

## 3.2 Eigenschaften der im FLV enhaltenen enzymatischen Aktivität

### 3.2.1 Stabilität bei höheren Temperaturen

Neben dem Temperaturoptimum von Enzymen ist auch deren Stabilität bei höheren Temperaturen von Interesse. Die meisten Proteasen behalten nämlich ihre proteolytische Fähigkeit nur innerhalb eines sehr begrenzten

Temperaturbereiches. Viele Enzyme denaturieren bereits, wenn sie kurzfristig hohen Temperaturen ausgesetzt werden, die meisten globulären Proteine schon bei Temperaturen über 60°C bis 70°C. Dabei bedeutet Denaturierung das Entfalten der charakteristischen nativen Faltstruktur der Polypeptidkette eines globulären Proteines, was mit dem Verlust der enzymatischen Aktivität verbunden ist. Es gibt jedoch auch einige Proteine, welche nach der Denaturierung im Reagenzglas spontan wieder in ihre alte Form zurückkehren, ohne Einbuße der biologischen Aktivität. Diesen Vorgang nennt man Renaturierung. Als ein Extremfall für die Stabilität mancher Proteine seien thermophile Bakterien angeführt, welche in über 85°C heißen Quellen leben können. Die Proteasen dieser Mikroorganismen sind so stabil, daß sie selbst bei diesen hohen Temperaturen noch aktiv sind (21).

In den vorausgegangenen Versuchen zur Optimierung der Spaltbedingungen fand ein fünf Minuten langes Erhitzen auf 56°C statt, um Substrat und Enzym besser zugänglich zu machen. Dabei kam es offensichtlich zu keinem Aktivitätsverlust der Protease. Es war daher interessant, mehr über die Stabilität des Enzyms bei höheren Temperaturen herauszufinden. Dafür wurden zwei verschiedene Temperaturen bei verschieden langen Inkubationszeiten gewählt.

Die Inkubationstemperaturen betrugen 56°C und 95°C, die Dauer der Inkubation bei diesen Temperaturen fünf, zwanzig, achtzig und zweihundertundvierzig Minuten. Dabei wurde der Versuchsansatz mit FLV, jedoch ohne das Substrat erhitzt. Ansonsten galten die optimierten Versuchsbedingungen. Die Behandlung des Substrates erfolgte getrennt und erst nach der Hitzevorinkubation wurde es dem im Eiswasserbad abgekühlten FLV-Extrakt zugefügt. Die Dauer der Inkubation des gesamten Testansatzes betrug 24h.

Die Erhitzung der einzelnen Versuchsansätze bei 56°C ergab folgendes Bild (Abb.10): Nach fünf Minuten Vorinkubation des FLV-Extraktes bei 56°C und anschließender Inkubation mit dem Substrat für 24h wurde SSV p65 fast komplett abgebaut (Spur 2). Es ist nur eine schwache SSV p55 Bande zu sehen, während SSV p40 und SSV p25 deutlicher zu erkennen sind. Das SSV p30 hingegen läßt sich besonders gut nachweisen. Ähnliches gilt auch für die zwanzig Minuten lange Vorinkubation bei 56°C (Spur 3). Nach achtzig Minuten langer Erhitzung des FLV-Extraktes kommt es zu einer leichten Abnahme der enzymatischen Aktivität (Spur 4). Dies geht zunächst aus der etwas deutlicher sichtbaren SSV p65 Bande hervor. Auch die Intensität der SSV p40 Bande nimmt im Vergleich zu der in den Spuren 2 und 3 zu, die Intensität von SSV p30 und SSV p25 bleibt allerdings etwa gleich. Nach Inkubation für 240 Minuten bei 56°C ist deutlich mehr SSV p65 vorhanden (Spur 5), es ist relativ wenig SSV p30 entstanden. Die Intensität der SSV p55 und SSV p40 Banden ist vergleichbar mit der in Spur 4.

Für die Vorinkubation der Enzymquelle bei 95°C (Abb.11) wurden die gleichen Bedingungen wie für den Versuch bei 56°C gewählt. Auch hier kommt es nach einer Erhitzung für fünf beziehungsweise zwanzig Minuten noch zu einem vollständigen Abbau von SSV p65 (Spuren 2,3). Eine Anreicherung der Zwischenprodukte SSV p55 und SSV p40 findet nicht statt. Die Bildung von SSV p25 und insbesondere SSV p30 ist dagegen sehr ausgeprägt. Nach einer Vorinkubation von achtzig Minuten Dauer kommt es ebenfalls noch zu einer vollständigen Spaltung von SSV p65 (Spur 4). Nach der 4h langen Erhitzung des FLV-Extraktes bei 95°C ist hingegen eine enzymatische Aktivität des Enzymextraktes kaum noch nachweisbar. Während eine sehr ausgeprägte SSV p65 Bande vorliegt, sind weder SSV p30 noch SSV p25 nachweisbar. Aus diesen Versuchen geht folgendes hervor: Während es nach vier-

stündiger Inkubation von FLV bei 56°C lediglich zu einer Abnahme der enzymatischen Aktivität kommt, wird diese nach einer länger als achtzig Minuten dauernden Erhitzung auf 95°C völlig zerstört. Es handelt sich also um eine Protease, die sowohl gegenüber 56°C als auch gegenüber 95°C sehr stabil ist. Dies ist eine äußerst bemerkenswerte Eigenschaft der im FLV enthaltenen Protease, wenn man bedenkt, daß viele Proteasen, wie eingangs erwähnt, schon nach kurzer Erhitzung auf Temperaturen über 60°C bis 70°C ihre proteolytische Eigenschaft verlieren.

### 3.2.2 Stabilität bei niederen Temperaturen

Im allgemeinen gilt, daß Proteine bei 0°C recht stabil sind. Daß dies aber nicht der Fall zu sein braucht, zeigt das Beispiel der Pyruvat-Carboxylase aus der Vogelleber. Bei diesem Enzym wurde nachgewiesen, daß es bei Kälte recht labil, bei Temperaturen um 25°C jedoch stabil ist. Es trifft daher nicht grundsätzlich zu, daß niedere Temperaturen eine größere Stabilität bewirken. Zusätzlich wirkt sich wiederholtes Einfrieren und Auftauen sehr schädlich auf viele Proteine aus (6).

In diesem Zusammenhang stellte sich die Frage nach der Kältestabilität der im FLV enthaltenen enzymatischen Aktivität. Für die meisten Versuche stand nur Virus zur Verfügung, welches über mehrere Jahre bei einer Temperatur von -70°C gelagert worden war. Da für die Versuche wiederholtes Einfrieren und Auftauen der Enzymquelle notwendig war, sollte das Enzym im Hinblick auf Aktivitätsverluste durch wiederholtes Frieren-Tauen hin untersucht werden.

Hierfür wurden mehrere FLV-Proben in flüssigem Stickstoff eingefroren und in einem Wasserbad bei Raumtemperatur wieder aufgetaut. Anschließend kam das

getrennt behandelte Substrat hinzu und die Proben inkubierten für 24h. Das Einfrieren in flüssigem Stickstoff erfolgte, um den Prozeß des Einfrierens möglichst kurz zu gestalten, da es bei diesem Vorgang zu einer Veränderung der Salzkonzentration und der Dissoziationskonstanten kommt, wodurch bei langsamem Einfrieren Proteine denaturiert werden können. Die erste Probe inkubierte als positive Kontrolle für 12h. Sie entsprach den bisher gewählten Bedingungen. Die restlichen Proben hingegen wurden wiederholt eingefroren und wieder aufgetaut. Wie aus Abbildung 12 hervorgeht, wird die enzymatische Aktivität des FLV weder nach zweimaligem (Spur 3), viermaligem (Spur 4), oder achtmaligem Frieren-Tauen (Spur 5) reduziert. Die Inkubationszeit von 12h wurde gewählt um zu gewährleisten, daß das SSV p65 nicht vollständig abgebaut war. Somit konnte eine Anreicherung der Zwischenprodukte festgestellt werden, aufgrund derer gewisse quantitative Aussagen über die enzymatische Aktivität in den einzelnen Versuchsansätzen möglich sind. Da jedoch selbst nach achtmaligem Einfrieren und anschließendem Wiederauftauen keine sichtbare Reduktion feststellbar war, darf davon ausgegangen werden, daß das Enzym in dieser Hinsicht sehr stabil ist. Daher ist das für die Versuche einzusetzende FLV aliquotiert, in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -70°C gelagert worden. Weitere Experimente in dieser Richtung ergaben, daß die im FLV enthaltene proteolytische Aktivität nach einer 7 Tage dauernden Lagerung bei 4°C völlig zerstört war (Ergebnisse nicht gezeigt).

### 3.2.3 Verschiedene Detergentien

Bei den Versuchen zur Optimierung der Versuchsbedingungen hatte es sich gezeigt, daß die im FLV enthaltene proteolytische Aktivität eine geringe Menge an NP 40 benötigt (3.1.3). Dieses nicht ionische

Detergens war aber selbst bei einer Endkonzentration von 1% nicht in der Lage, virale Partikel und "cores" vollständig zu zerstören (Ergebnisse dieser elektronenmikroskopischen Untersuchung nicht gezeigt). Daher sollte der Einfluß von ionischen Detergentien allein und im Zusammenwirken mit NP 40 sowohl im Hinblick auf einen besseren Aufschluß von Partikeln und "cores" als auch auf ihre Wirkung bezüglich der enzymatischen Aktivität untersucht werden.

Hierzu sind als ionische Detergentien Natriumdodecylsulfat (SDS) und Natriumdesoxycholat (DOC) in verschiedenen Konzentrationen benutzt worden (Abb.13). Alle Proben mit Ausnahme der in Spur 6 der Abb.13 aufgetragenen enthielten 1% NP 40. In Spur 1 ist das Ausgangsmaterial zu sehen. Als positive Kontrolle fungierte eine Probe unter den ausgearbeiteten optimierten Bedingungen; unter diesen Voraussetzungen kam es zu einem vollständigen Abbau von SSV p65 (Spur 2). Die Zwischenprodukte SSV p55 und SSV p25 treten schwach auf, während SSV p30 gut zu sehen ist. Nach der Zugabe von 0,1% SDS zum optimierten Versuchsansatz wird der Abbau von SSV p65 weitestgehend unterdrückt (Spur 3). Es wird nur wenig SSV p30 gebildet und die Zwischenprodukte SSV p55 und SSV p25 sind nicht nachweisbar. Dasselbe gilt für die Hinzufügung von 0,5% DOC zum Versuchsansatz (Spur 4). Hier wird die Spaltung von SSV p65 ähnlich inhibiert wie durch 0,1% SDS. Werden jedoch lediglich 0,1% DOC eingesetzt, kommt es zu einem teilweisen Abbau von SSV p65 (Spur 5). Die SSV p55 Bande nimmt stark an Intensität zu, SSV p25 wird dagegen nur schwach gebildet. Beim Einsatz von 0,5% DOC in einem Versuchsansatz ohne NP 40 wird der Abbau von SSV p65 ebenfalls fast vollständig unterbunden (Spur 6). Daraus geht hervor, daß die beiden eingesetzten ionischen Detergentien in relativ geringen Konzentrationen die enzymatische Aktivität eindeutig inhibieren. Im Gegensatz dazu war das nicht ionische Detergens NP 40 im

Versuchsansatz notwendig für einen guten Abbau von SSV p65 und zeigte auch bei höheren Konzentrationen keinen negativen Einfluß auf die proteolytische Tätigkeit dieses Enzyms. Somit erwiesen sich die ionischen Detergentien als unbrauchbar, um Viren und "cores" vollständig aufzubrechen, da es durch ihren Einfluß zur vollständigen Inhibition der enzymatischen Aktivität kam.

### 3.2.4 Inhibition

Eine Möglichkeit, das aktive Zentrum eines Enzyms näher zu bestimmen, besteht in dem Gebrauch von Reagenzien, welche durch kovalente Bindung verschiedene Gruppen in Enzymen modifizieren. Diese Substanzen definieren die Notwendigkeit einer bestimmten chemischen Gruppe in Bezug auf die katalytische Tätigkeit des Enzyms. Proteasen kann man aufgrund ihrer Empfindlichkeit gegenüber verschiedenen Inhibitoren in mehrere Gruppen unterteilen, wie zum Beispiel in Serin- und Thiol-Proteasen. Bei Phenylmethansulfonylfluorid (PMSF) handelt es sich um einen Inhibitor, welcher die Hydroxylgruppe von Serin durch Phosphorylierung inaktiviert. Enzyme, welche auf diese Weise inaktiviert werden, bezeichnet man als Serinproteasen. N-Ethylmaleimid (NEM) und Para-4-Hydroxymercuribenzoesäure (PCMB) hingegen inhibieren Enzyme durch Bindung an eine SH-Gruppe im aktiven Zentrum. Auf diese Weise hemmbare Enzyme bezeichnet man als Thiolproteasen. Eine weitere Möglichkeit der Inhibition besteht in der kovalenten Bindung eines Substratähnlichen Moleküls an die aktive Gruppe eines Enzyms. Zu dieser Art Inhibitoren gehören L-1-chlor-3-4-tosylamido-7-amido-2-heptanon (TLCK) und L-1-chlor-3-4-tosylamido-4-phenyl-2-butanon (TPCK), welche ebenfalls Serinproteasen inhibieren (21).

Im Verlauf der im Folgenden beschriebenen Untersuchung wurde die im FLV nachgewiesene proteolytische Aktivität mit verschiedenen Inhibitoren inkubiert. Das Ziel bestand darin, herauszufinden, ob sich diese Protease der Serin- oder der Thiol-Proteasefamilie zuweisen läßt. Eine Zugehörigkeit zu Metallo- oder Carboxylproteasen wurde nicht untersucht, da die publizierten Daten aus anderen Retrovirussystemen eher auf eine Serin- oder Thiol-Protease hindeuteten.

Tabelle 1:

| Inhibitoren | Inhibition der Spaltung von SSV p65 durch die im FLV enthaltene Protease | Eingesetzte Endkonzentration der Inhibitoren |
|---|---|---|
| Serinprotease-inhibitor: | | |
| PMSF | - | 5mM |
| Substrat-ähnliche Inhibitoren.: | | |
| TLCK | +++ | 5mM |
| TPCK | + | 5mM |
| Thiolprotease-inhibitoren: | | |
| PCMB | +++ | 50mM |
| NEM | +++ | 50mM |

+++ = vollständige Inhibition
+ = teilweise Inhibition
- = keine Inhibition

Wie aus Tabelle 1 hervorgeht, kommt es bei Inkubation mit PCMB und NEM zu einer vollständigen Inhibition der FLV assoziierten Protease. Dabei wurden beide Inhibitoren in zehnfachem Überschuß, verglichen mit der

Menge des eingesetzten DTT, zugegeben. Diese Konzentrationen waren notwendig, um sicher zu sein, daß neben eventuell vorhandenen SH-Gruppen des Enzyms auch diejenigen des Reduktionsmittels inaktiviert waren. Die eingesetzten Thiolproteaseinhibitoren unterbanden somit den Abbau von SSV p65. Dies war zu erwarten, da das für die Reaktion notwendige Reduktionsmittel (siehe 3.1.5) durch die Inhibitoren inaktiviert worden war. Es sollte jetzt genauer untersucht werden, welchen Einfluß der Serin-Protease-Inhibitor PMSF und die substratähnlichen Inhibitoren TPCK und TLCK auf die proteolytische Aktivität ausübten. Hierzu wurden pro Inhibitor zwei Proben angesetzt; bei der ersten erfolgte die Inhibitorzugabe sofort, bei der zweiten jedoch erst nach zweistündiger Inkubation des Ansatzes. Dies geschah, um herauszufinden, ob einer der Inhibitoren möglicherweise einen ganz bestimmten Schritt beim Abbau von SSV p65 unterbindet. Wie aus Abbildung 14 ersichtlich ist, kommt es nur bei einem der eingesetzten Inhibitoren (TLCK) zu einer eindeutigen Blockierung des Abbaues von SSV p65. Bei der angegebenen Endkonzentration hemmt der Serinprotease-spezifische Inhibitor PMSF nicht die FLV assoziierte proteolytische Aktivität. Weder der erste Schritt der Spaltung von SSV p65 zum SSV p55, noch einer der folgenden Schritte wird sichtbar beeinflußt (Spuren 6,7). Bei TPCK kommt es zu einer geringfügigen Inhibition der Prozessierung von SSV p65, was sowohl an der noch vorhandenen SSV p65, als auch an der recht intensiven SSV p55 Bande zu sehen ist (Spur 4). In Bezug auf PMSF und TPCK konnte kein Unterschied im Proteinbandenmuster gefunden werden, unabhängig davon, ob der Inhibitor sofort oder erst nach 2 Stunden zugegeben wurde. Die Proteinbanden gleichen denen der positiven Kontrolle in Spur 8. Anders verhält sich dagegen das TLCK. Hier kommt es nach Vorinkubation des Virusextraktes mit dem Inhibitor zu einer vollständigen Blockierung des Abbaues von SSV p65 (Spur 2). Das Muster

der Proteinbanden ist mit dem des Ausgangsmateriales (Spur 1) identisch. Bei Zugabe des Inhibitors 2h nach Inkubationsbeginn kommt es ebenfalls zu einer Hemmung der Spaltung von SSV p65 und seiner Zwischenprodukte (Spur 3). Die Proteinbanden sind vergleichbar mit denen in Spur 9, in welcher eine Probe aufgetragen ist, welche nach 2h Inkubation gestoppt wurde. Da mit TLCK ein Reagenz gefunden war, mit dessen Hilfe sich der Abbau von SSV p65 vollständig unterdrücken ließ, sollte noch näher untersucht werden, ob an der Prozessierung von SSV p65 nur ein oder mehrere Enzyme beteiligt sind. Die Überlegung hierzu war folgende: Wie aus Abbildung 14 ersichtlich, wird durch TLCK jegliche Spaltung von SSV p65 zu SSV p55 (dem vermutlich ersten Spaltungsschritt, siehe auch Diskussion) unterbunden. Somit ist aufgrund dieses Versuches allein noch keine Aussage darüber möglich, ob an dem Abbau von SSV p65 eine weitere Protease(n) beteiligt sein könnte. Es war daher notwendig, den Inhibitor zu verschiedenen Zeitpunkten genau dann zuzugeben, wenn auch die einzelnen Zwischenprodukte des Abbaues von SSV p65 nachweisbar waren. Inhibierte TLCK nur den ersten Schritt des Abbaues von SSV p65, so mußten die entstandenen Zwischenprodukte bei den Proben, zu denen TLCK erst später zugefügt worden war, weiter abgebaut werden. Daher wurde eine Zeitkinetik angefertigt, wobei ein Teil der Proben zuerst unterschiedlich lange vor der Zugabe von TLCK unter den optimierten Bedingungen inkubierte. Alle Proben wurden mit Substrat für 24h inkubiert. Dieser Versuch ist in Abbildung 15 dargestellt.

Die Inhibitorkontrolle war der ohne Substrat mit TLCK für 1,5h inkubierte FLV-Extrakt. Anschließend wurde das Substrat hinzugefügt. Bei allen weiteren Versuchsansätzen ist für verschieden lange Zeiten unter optimierten Bedingungen inkubiert worden, bevor die Zugabe des Inhibitors erfolgte. Die Zeitpunkte dieser

Inhibitionskinetik waren 1,5h, 4,5h und 9h, da bei diesen Zeitwerten die einzelnen Zwischenprodukte in unterschiedlich starken Konzentrationen vorlagen, wodurch der etwaige Abbau der einzelnen Zwischenprodukte durch eine zusätzliche Protease sichtbar geworden wäre. Eine Probe inkubierte für 9h als positive Kontrolle ohne Inhibitor. Wie aus Abbildung 15 ersichtlich ist, findet nach Inkubation der enzymatischen Aktivität mit TLCK praktisch kein Abbau von SSV p65 statt (Spur 2). Bei der Zugabe von TLCK nach 1,5h Vorinkubation der Probe ist schon deutlich SSV p65 abgebaut. Es ist eine starke SSV p55 Bande zu sehen, auch SSV p30 und SSV p25 sind gut zu erkennen (Spur 3). Dies bedeutet, daß der Abbau aller zum Zeitpunkt 1,5h vorhandenen Zwischenprodukte, als auch der von SSV p65 durch Zugabe des Inhibitors gestoppt wurde. Diese Aussage gilt auch für die folgenden Zeitwerte. Dauerte die Vorinkubation 4,5h, so war SSV p65 schon weitgehend abgebaut, die SSV p55 Bande noch stärker ausgeprägt als in Spur 3, ebenso SSV p30 und SSV p25. Die Intensität der SSV p40 Bande ist hingegen geringer (Spur 4). Bei Zugabe des Inhibitors nach 9h Vorinkubation verändert sich das Proteinbandenmuster im Vergleich zu Spur 4 kaum. SSV p65 ist nun vollständig abgebaut, SSV p55 nimmt an Intensität leicht ab. Während SSV p30 und SSV p25 an Intensität weiter zunehmen, ist SSV p40 kaum zu erkennen (Spur 5). Dieses Proteinbandenmuster ist identisch mit der positiven 9h Kontrolle ohne Inhibitor. Auch die Inhibition nach 9h und nachfolgender 15h Inkubation ergab somit keine Veränderung der Proteinbanden im Vergleich zur positiven Kontrolle. Damit war gezeigt, daß bei der Zugabe des Inhibitors TLCK zu verschiedenen Abbaustadien von SSV p65 sowohl der Abbau von SSV p65, als auch der von SSV p55 und SSV p40 gestoppt wurde. Aufgrund dieser Experimente kann folgendes geschlossen werden: Entweder wird SSV p65 nur durch ein TLCK inhibierbares Enzym prozessiert, oder es ist eine weitere, ebenfalls durch

TLCK inhibierbare Protease an der Spaltung von SSV p65 beteiligt.

### 3.3 Lokalisation der im FLV enthaltenen enzymatischen Aktivität

### 3.3.1 Elektronenmikroskopische Untersuchungen

In allen bisherigen Versuchen wurde als Enzymquelle Virusmaterial benutzt, welches bei -70°C lagerte. Wie oft und in welcher Weise dieses Material schon aufgetaut und wieder eingefroren worden war, war nicht bekannt. Bei den Vorgängen des Einfrierens und Auftauens kann es zu einem Aufbrechen von viralen "envelopes" und "cores" kommen. Daher konnte dieses Virusmaterial nicht zu genaueren Angaben über die Lokalisation der proteolytischen Aktivität im Virus herangezogen werden. Hierzu war es notwendig, frisch gereinigtes, nicht eingefrorenes Virus zu verwenden. Eine solche FLV-Präparation wurde noch am Tage ihrer Ernte aufgearbeitet (zweimaliges Pelletieren des Virus aus dem zellfreien Gewebekulturüberstand). Mit Hilfe einer Ätherbehandlung der konzentrierten Viren erfolgte die Reinigung viraler "cores" (19). Dadurch war es möglich, gereinigte, intakte "cores" stark anzureichern. Diese "core" Präparation wurde ebenso wie ein Teil des unbehandelten Virus über Nacht bei 4°C gelagert. In den Versuchen zur näheren Lokalisation des Enzyms sind deshalb sowohl intaktes Virus als auch gereinigte "cores" eingesetzt worden.

Um die Anteile an intakten Viren und intakten "cores" in den einzelnen Versuchsansätzen zu überprüfen, wurde jeweils ein Aliquot der im Versuch eingesetzten Proben mit Hilfe des Elektronenmikroskopes untersucht. Zudem sollte auch abgeklärt werden, wie homogen die "core" Präparation war und inwieweit sie aus intakten "cores"

bestand. Wie sich die einzelnen Präparationen unter dem Elektronenmikroskop darstellten, ist auf den Abbildungen 16a-c zu sehen. Auf Abbildung 16a sind frisch geerntete, weitgehend intakte Viruspartikel zu sehen, wie sie in einer Probe des folgenden Versuches eingesetzt wurden. Die Unversehrtheit der Viruspartikel ist an ihrer Größe (Durchmesser ca. 100 nm), ihrer gut sichtbaren hexagonalen Struktur und an den deutlich sichtbaren, durch das virale gp 70 gebildeten sogenannten "knobs" (Knöpfe) zu erkennen. Abb. 16b zeigt gereinigte, intakte "cores", welche nicht mehr die hexagonale Struktur und die auf der Lipid-Membran befindlichen "knobs" aufweisen. Auch sind sie im Vergleich mit den intakten Viruspartikeln kleiner (Durchmesser ca. 60 nm). Auf den Abbildungen 16c und 16d sind die gereinigten Viruspartikel und die gereinigten "cores" nach der Behandlung unter optimierten Bedingungen (einschließlich Erhitzung bei 56$^{o}$C) zu sehen. Es ist deutlich erkennbar, daß bei den behandelten Viruspartikeln (16c) sowohl die Hülle als auch das "core" völlig zerstört sind. Auch die erhitzten "cores" liegen aufgebrochen vor (Abb.16d). Mit Hilfe des Elektronenmikroskopes wurde so gezeigt, daß die einzelnen Versuchsansätze als Enzymquelle einerseits intakte Viren (unbehandeltes Startmaterial) beziehungsweise intakte "cores", andererseits völlig zerstörte Viren beziehungsweise zerstörte "cores" enthielten. Zudem war die Homogenität der "core" Präparation bezüglich intakter "cores" nachgewiesen.

### 3.3.2 Untersuchungen "in vitro"

Der eigentliche Versuch zur näheren Lokalisation des Enzyms gliederte sich in zwei Teile: Im ersten Teil wurde zunächst unbehandeltes Virus ohne Detergens, Erhitzen und Beschallen eingesetzt. Dies erfolgte, um nachzuprüfen, ob die enzymatische Aktivität auf der Außenseite des viralen "envelopes" lokalisiert ist.

Weiterhin erfolgte die Behandlung und Inkubation dieses Virus analog zu den ausgearbeiteten optimierten Bedingungen. Die gleichen Bedingungen galten in Teil zwei für die gereinigten "cores".

Das Ergebnis dieses Versuches ist in Abbildung 17 zu sehen. Spur 1 stellt dabei das Substrat ohne Enzymbehandlung (Startmaterial) dar. Zu einem vollständigen Abbau von SSV p65 kam es bei den beiden Proben, bei denen entweder das konzentrierte Virus (Abb.17, Spur 3), oder die gereinigten "cores" (Abb.17, Spur 5) mit NP 40 unter optimierten Bedingungen eingesetzt wurden. Die dabei eingesetzten Mengen an viralem Protein wurden dabei mit Hilfe eines Lowry-Tests bestimmt. Es ist kein SSV p65 und eine deutliche SSV p55 Bande zu sehen. SSV p30 und SSV p25 sind ebenfalls sehr ausgeprägt, während SSV p40 nicht nachweisbar ist. Anders verhält es sich bei den Proben, in welchen intaktes Virus und intakte "cores" eingesetzt worden waren. Weder bei der Verwendung von intakten Viren (Spur 2) noch von intakten "cores" (Spur 4) entstehen aus dem SSV p65 die Produkte SSV p55, SSV p40, SSV p30 und SSV p25. Hier kam es somit zu keinem Abbau von SSV p65. Dies bedeutet folgendes: Die Protease ist nicht auf der Oberfläche des "envelopes" beziehungsweise des "cores" nachweisbar, da in den Versuchsansätzen mit intaktem Virus beziehungsweise intakten "cores" SSV p65 nicht prozessiert wurde. Aus diesem Ergebnis läßt sich weiterhin schließen, daß die Protease weder während der "core" Reinigung noch während der Inkubation aus dem Virus oder dem "core" freigesetzt wird. Befände sich die Protease zwischen "envelope" und "core", so dürfte SSV p65 nur in der Probe abgebaut werden, in welcher unbehandeltes Virus unter optimierten Bedingungen eingesetzt worden war. Inkubierte man jedoch sowohl das Virus als auch die "cores" unter optimierten Bedingungen, bei denen intakte Viren und intakte "cores" zerstört werden, kam es bei

beiden Versuchsansätzen zur vollständigen Spaltung von SSV p65. Daher zeigen diese Daten, daß sich die mit FLV assoziierte Protease im "core" befindet.

### 3.4 Verschiedene Markierungen des SSV p65

Alle bisher beschriebenen Versuche wurden mit $^{3}$H-Leucin markierten Viruspartikeln als Substrat durchgeführt. Damit konnte SSV p65, die Zwischenprodukte SSV p55, SSV p40, SSV p25 und auch das Endprodukt SSV p30 nachgewiesen werden. Es konnte jedoch nicht das Auftreten der Endprodukte SSV p15, SSV p12 und SSV p10 gezeigt werden.

Dies konnte mehrere Ursachen haben:

a) Die genannten drei Proteine SSV p15, SSV p12 und SSV p10 werden nicht gebildet. Dagegen spricht jedoch das Auftreten von SSV p55, bei dessen Entstehen auch SSV p10 gebildet werden sollte.

b) Die genannten Endprodukte der Spaltung von SSV p65 werden durch $^{3}$H-Leucin nicht, beziehungsweise nicht ausreichend markiert, sodaß man ihr Auftreten bei der Fluorographie nicht erkennt.

c) Wie bereits erwähnt, enthält SSV p25 Determinanten von SSV p15 und SSV p12 (siehe Einleitung). Da sich SSV p25 in allen bisher durchgeführten Versuchen als eine relativ schwache Proteinbande dargestellte, bestand die Möglichkeit, daß eine etwaige Prozessierung des SSV p25 nicht sichtbar wurde.

Um herauszufinden, welche der unter a-c aufgeführten Ursachen zutraf, wurde nach Aminosäuren gesucht, welche zum einen in SSV p10, zum anderen in SSV p15 und SSV p12 besonders häufig vorhanden sind. Aufgrund der bekannten Nukleinsäuresequenz und der daraus abgeleiteten Aminosäurensequenz von SSV p65 (8) wurden zur radioaktiven Markierung neben $^{3}$H- Leucin auch $^{3}$H-Prolin (für SSV p25)

und $^{35}$S-Cystein (für SSV p10) verwendet. Die spezifische Markierung von SSV p15 erfolgte mit $^{3}$H-myristic acid, da p15 als einziges Strukturprotein diese Fettsäure enthält (30).

### 3.4.1 $^{3}$H-Leucin Markierung

Um festzustellen, welche Unterschiede im Proteinbandenmuster unter verschiedenen Markierungsbedingungen auftraten, ist eine Zeitkinetik mit $^{3}$H-Leucin und $^{35}$S-Cystein markierten Partikel angefertigt worden. Die Zeitpunkte waren 1h, 3h, 9h und 27h. In Abbildung 18 ist der Abbau von $^{3}$H-Leucin markiertem SSV p65 zu sehen. Spur 1 stellt das Ausgangsmaterial dar. Schon nach einer Stunde (Spur 2) tritt als erstes Spaltprodukt von SSV p65 das SSV p55 auf; SSV p40, SSV p30 und SSV p25 sind dagegen nicht zu erkennen. Nach drei Stunden (Spur 3) hat die SSV p55 Bande an Intensität weiter zugenommen und SSV p30 ist bereits schwach zu sehen; SSV p40 und SSV p25 sind hingegen nicht erkennbar. Während der neun Stunden langen Inkubation wurde der größte Teil von SSV p65 abgebaut (Spur 4). Es kommt zu keiner Intensitätsveränderung der SSV p55 Bande, jedoch ist nun sehr deutlich SSV p30 zu erkennen, sowie eine sehr schwache SSV p25 Bande. Zum vollständigen Abbau von SSV p65 ist es dann nach 27h gekommen (Spur 5). Die SSV p55 Bande zeigt eine geringere Intensität, wogegen SSV p30 und auch SSV p25 deutlicher zu sehen sind. Es sind keine neu auftretenden Banden im Bereich von SSV p15, SSV p12 oder SSV p10 zu erkennen.

### 3.4.2 $^{35}$S-Cystein Markierung

Bei der Cystein Kinetik (Durchführung wie bei $^{3}$H-Leucin unter 3.4.1) ergab sich folgendes Bild (Abb.19): Wie bei der $^{3}$H-Leucin-Markierung nimmt auch bei der $^{35}$S-Cystein Kinetik SSV p65 im Laufe der Inkubation ab (Spuren 2-5).

Die SSV p55 Bande nimmt zwischen 3h und 9h (Spuren 3,4) an Intensität zu und nach 27h wieder ab (Spur 5). Das Gleiche gilt auch für die SSV p40 Bande. Verbunden mit dem Abbau von SSV p65 innerhalb von 27h nehmen SSV p30 und SSV p25 zu. Eine, bei der $^{3}$H-Leucin Markierung nicht nachweisbare Bande tritt jetzt im Molekulargewichtsbereich von etwa 10.000 d (SSV p10) auf und nimmt innerhalb der Kinetik kontinuierlich an Intensität zu. Da sich diese Bande mit $^{3}$H-Leucin markierten Partikeln nicht nachweisen ließ, wurde das SSV p10 bei der $^{3}$H-Leucin Markierung tatsächlich nicht ausreichend markiert. Somit konnte mit Hilfe der $^{35}$S-Cystein Markierung nachgewiesen werden, daß beim Abbau von SSV p65 tatsächlich SSV p10 entsteht. Es sollte noch darauf hingewiesen werden, daß sich SSV p30 und SSV p25 mit $^{35}$S- Cystein nur schwach markieren ließen. Dabei fällt auf, daß die in sämtlichen bisherigen Experimenten vorhandene Bande direkt unter dem SSV p30 nicht nachweisbar ist. Daraus ergibt sich, daß sich das NRK p27 mit $^{35}$S-Cystein nicht markieren läßt.

### 3.4.3 $^{3}$H-Prolin Markierung

Da SSV p25 mit $^{3}$H-Leucin nur schwach markierbar war (s.u.a. Abb.9-11) und daher die bei seinem Abbau entstehenden Produkte eventuell nicht nachweisbar waren, ist zusätzlich noch mit $^{3}$H-Prolin markiert worden. Aufgrund der abgeleiteten Aminosäuresequenz (s. 4.0) sollte sich mit dieser Aminosäure SSV p12 und somit auch SSV p25 besonders gut markieren lassen. Bei diesen Versuchen inkubierte FLV für 27h mit $^{3}$H-Prolin markierten Partikeln.

In Abb.20, Spur 1 wurde das Ausgangsmaterial ($^{3}$H-Prolin markierte Partikel) aufgetragen, in Spur 3 die Kontrolle ohne FLV. Sowohl im Ausgangsmaterial als auch in der Kontrolle ist eine stark markierte SSV p65 Bande zu

sehen, jedoch keines der bei seinem Abbau entstehenden Zwischen- und Endprodukte. In Spur 2, in welcher die mit FLV-Extrakt für 27h inkubierte Probe aufgetragen ist, kann man kein SSV p65 mehr sehen. Dafür ist das Zwischenprodukt SSV p55 und das Endprodukt SSV p30 zu erkennen. Im Vergleich mit $^{3}$H-Leucin markierten Partikeln sind diese Banden nicht stärker ausgebildet. Während SSV p40 nicht nachweisbar ist, kommt es zur Bildung einer sehr intensiven SSV p25 Bande, welche im Vergleich mit $^{3}$H-Leucin markiertem SSV p25 deutlich an Intensität zugenommen hat. Trotz der besseren Markierung von SSV p25 sind auch hier weder SSV p12 noch SSV p15 zu erkennen. Dies ist ein Hinweis dafür, daß SSV p25 unter diesen "in vitro" Bedingungen nicht abgebaut wird.

### 3.4.4 $^{3}$H-Myristylsäure Markierung

Erst kürzlich wurde durch Massenspektralanalyse (15) gezeigt, daß das "gag" Protein p15 eines murinen Leukaemie Virus als posttranslationale Modifikation am $NH_2$-terminalen Ende ein myristyl-Amid aufweist. Schultz und Oroszlan (29) berichteten nun, daß p15 als einziges virales Strukturprotein diese Fettsäure aufweist. Dies konnten sie ebenfalls für Retroviren von anderen Species nachweisen, unter anderem für SSAV. Es sollte untersucht werden, ob sich SSV p65 auch mit $^{3}$H-myristic acid markieren läßt. Damit wäre die Möglichkeit gegeben, SSV p15 gezielt zu markieren und im SSV p65 und in Zwischenprodukten nachzuweisen. Es sollte dadurch möglich sein, das eventuelle Entstehen von SSV p15 während der Spaltung von SSV p65 verfolgen zu können.

Im Vergleich mit der $^{3}$H-Leucin und der $^{35}$S-Cystein Kinetik zeigt der zeitliche Abbau von $^{3}$H-myristic acid markiertem SSV p65 ein völlig anderes Bild. Schon im Startmaterial sind nur zwei Banden zu sehen, nämlich SSV p65 und p15 des endogenen Virus (NRK p15), (Abb.21, Spur

1). Nach einer vier Stunden langen Inkubation (Spur 2) ist bereits kein SSV p65 mehr zu sehen und SSV p55 und SSV p25 treten auf. Es sind weder SSV p40 noch SSV p30 zu erkennen. Dies ist auch nicht zu erwarten, da SSV p15 weder in dem Zwischenprodukt SSV p40 (bestehend aus SSV p30 und SSV p10), noch in dem Endprodukt SSV p30 enthalten ist (s.a. Abb.2b). Ähnlich wie nach vier Stunden Inkubation sieht das Muster der Proteinbanden nach acht Stunden Inkubation (Spur 3) aus. Hier nimmt SSV p25 nur leicht an Intensität zu. Nach zwölf Stunden Inkubation (Spur 4) ist SSV p55 nur noch schwach zu sehen, SSV p25 nimmt weiter an Intensität zu. Zu einem vollständigen Abbau von SSV p55 ist es nach 24 Stunden gekommen (Spur 5). Dabei nimmt die SSV p25 Bande an Intensität nicht mehr sichtbar zu. Auch eine Inkubation für 48 Stunden verändert dieses Proteinbandenmuster nicht mehr (Spur 6). Im Verlauf der gesamten Kinetik tritt keine neue Bande in Höhe von 15.000 d auf, was darauf hinweist, daß SSV p25 unter diesen "in vitro" Bedingungen tatsächlich nicht weiter gespalten wird. Die Versuche mit $^{3}$H-Prolin (3.4.3) und mit $^{3}$H-myristic acid markierten Partikeln zeigen, daß das SSV p25 unter diesen Bedingungen ein Endprodukt der "in vitro" Spaltung darstellt.

## 4. DISKUSSION

Die Synthese der Strukturproteine von Retroviren erfolgt über Vorläufermoleküle ("precursor"), die unmittelbar vor oder während der Sprossung ("budding") dieser Viren enzymatisch gespalten werden (9, 10, 11, 14, 15, 16, 23, 25, 26, 28, 29, 30, 34, 37, 38, 39, 42, 43, 45, 47). Dieser Vorgang scheint für die Infektiosität der gebildeten Viruspartikel von besonderer Bedeutung zu sein (7, 10, 11, 13, 16, 24, 31, 32, 36). Vom aviären Myeloblastose Virus (AMV) weiß man, daß für die Spaltung seines "gag precursor" eine Virus kodierte Protease (AMV p15) verantwortlich ist (9, 14, 18, 25, 37, 38). Anders verhält es sich bei Säugerretroviren. Hier konnte bisher lediglich die Assoziation einer proteolytischen Aktivität mit gereinigten Viren nachgewiesen werden, wobei die vier "gag" Strukturproteine als Enzymquelle ausgeschlossen wurden (17, 23, 26, 41, 43, 44, 47, 48). Da weder die Lokalisation des Enzyms im Virus, noch ein für diese Protease kodierender Genomabschnitt des Virus bekannt ist, weiß man bei den Säugerretroviren bisher nicht, ob das für die Spaltung des "gag precursor" notwendige Enzym schon in der Zelle vorhanden ist, erst nach Infektion durch das Virus induziert wird, oder ob es vom Virus selbst kodiert ist.

Ähnlich wie durch andere Säugerretroviren transformierte Zellen enthalten auch SSV-NP Zellen "gag"-verwandte Proteine, die im Gegensatz zum SSAV $pr65^{gag}$ intrazellulär nicht prozessiert werden (34). Beim SSV p65 besteht eine sehr große immunologische und serologische Verwandtschaft zum SSAV $pr65^{gag}$ (34). Nach Überinfektion von SSV-NP Zellen mit verschiedenen Helferviren erfolgte eine korrekte Spaltung von SSV p65 (35). Unsere Arbeitshypothese besagte, daß das Helfervirus für ein den "gag precursor" spaltendes Enzym kodiert. Zur Unterstützung dieser Annahme wurde zusätzlich zu der beschriebenen "in

vivo" Spaltung (35) ein "in vitro" System etabliert.

Die Enzymquelle war das heterologe Helfervirus FLV, welches bei der "in vivo" Spaltung erfolgreich eingesetzt worden war. Die in dieser Arbeit durchgeführten Versuche wurden vorwiegend mit $^{3}$H-Leucin markiertem SSV p65 als Substrat durchgeführt. Das in der Zeitkinetik (Abb.18) zunächst bei der Spaltung von SSV p65 "in vitro" auftretende Molekül ist das SSV p55. Dies legt nahe, daß unter den gewählten Versuchsbedingungen die Spaltstelle zwischen SSV p30 und SSV p10 bevorzugt vom spaltenden Enzym erkannt wird (s.a. Abb.19). Anschließend an die Spaltung in SSV p55 und SSV p10 erfolgte der Abbau von SSV p55 zu SSV p25 und SSV p30. Das dabei entstehende 30.000d große Molekül komigrierte auf der SDS-PAGE mit dem SSAV p30 und wurde deshalb als SSV p30 bezeichnet. Der Abbau von SSV p65 über SSV p40 und SSV p25 (s.a. Abb.2b) scheint dagegen ein Nebenweg der "gag" Spaltung zu sein, da SSV p40 erst nach längerer Inkubation und nicht regelmäßig auftritt. SSV p25 hingegen, welches sich aus SSV p15 und SSV p12 zusammensetzt, wird in diesem Versuchsansatz nicht nachweisbar weiter abgebaut, was durch gezielte Markierung mit $^{3}$H-Prolin und $^{3}$H-Myristylsäure (Abb.20, 21) gezeigt wurde. Der in der Literatur beschriebene "in vitro" Abbau von "gag" Vorläufermolekülen durch Extrakte aus dem murinen Moloney Leukämie Virus (Mo-MuLV) führte zu vergleichbaren Zwischenprodukten (23, 26, 32, 42, 44, 46, 47, 48). Über die genauere Abfolge der Entstehung der einzelnen Zwischenprodukte und Endprodukte herrscht noch keine einhellige Meinung. Aufgrund vergleichender Studien der "in vitro" Reihenfolge bei der Entstehung der einzelnen Zwischenprodukte mit der durch "pulse-chase" Experimenten erhaltenen Reihenfolge "in vivo", scheint der Abbau in beiden Fällen nach demselben Muster zu erfolgen (Ergebnisse nicht gezeigt). Ob die im FLV enthaltene Protease nicht in der Lage ist, "in vitro"

SSV p25 zu spalten, oder ob geänderte Versuchsbedingungen einen weiteren Abbau von SSV p25 ermöglichen, ist bis zum jetzigen Zeitpunkt noch ungeklärt. Ähnliche Schwierigkeiten sind aus anderen Retrovirussystemen bekannt (23).

Als geeignete "in vitro" Inkubationstemperatur erwies sich 24°C, was auch mit den in anderen Arbeiten angegebenen Daten übereinstimmt (23, 41, 42, 44). Ebenso bedurfte der anfangs gewählte pH-Bereich, welcher mit den pH-Optima ähnlicher Proteasen anderer Säugerretroviren (26, 41, 46), nicht aber mit dem bei AMV p15 gefundenen pH-Optimum übereinstimmt, keiner Veränderung. Eine wichtige Rolle bei der Zusammensetzung des "in vitro" Versuchsansatzes spielte auch das eingesetzte Detergens. Während die ionischen Detergentien SDS und DOC selbst in geringen Konzentrationen den Abbau von SSV p65 verhinderten, war eine geringe Menge des nicht ionischen Detergens NP 40 für eine gute Spaltung notwendig. Auch dies stimmt mit den bei anderen Säugerretroviren gefundenen Angaben überein (26, 41, 44, 46), wogegen bei den Hühnerretroviren geringe Mengen an ionischen Detergentien keinen inhibitorischen Einfluß auf die proteolytische Aktivität des Enzyms ausübten (9, 25). Ein bedeutender Faktor bezüglich der Effektivität der Spaltung von SSV p65 "in vitro" durch das im FLV enthaltene Enzym war die Konzentration des Reduktionsmittels DTT im Versuchsansatz. Eine Mindestkonzentration von 5 mM DTT erwies sich als notwendig, um eine gute Spaltung von SSV p65 zu erhalten. Ob das im Versuchsansatz notwendige DTT für die proteolytische Aktivität des Enzyms notwendig war, oder ob das Substrat durch Reduktion in seiner Konfiguration verändert und so dem Enzym erst zugänglich gemacht wird, geht aus diesem Versuch jedoch nicht hervor. Im Gegensatz zum FLV-Enzym benötigt AMV p15 kein reduzierendes Agens (9), während für die beim murinen Leukämie Virus gefundene

proteolytische Aktivität bisher noch nicht nachgewiesen ist, ob sie ein Reduktionsmittel benötigt oder nicht. In den entsprechenden Versuchsansätzen wurde allerdings immer DTT eingesetzt (26, 41, 44, 46). Da im SSV p65 mehrere Cysteinmoleküle vorhanden sind (8), besteht die Möglichkeit, daß es im zellfreien System (im "in vitro" Ansatz und/oder in den Viruspartikeln) zur Ausbildung intramolekularer Disulfidbrückenbindungen kommt, welche die Spaltstellen dem im FLV enthaltenen Enzym unzugänglich machen. Andererseits könnte auch das im FLV enthaltene Enzym eine Thiolprotease sein, welche zur Reduktion von Disulfidbrücken ein reduzierendes Agens benötigt. Eine weitere Möglichkeit wäre, daß das Enzym erst durch eine durch Reduktion bewirkte Konformationsänderung enzymatisch aktiv werden kann. Beim AMV p15 handelt es sich nachgewiesenermaßen um eine Thiolprotease (9), bei den bisher beschriebenen enzymatischen Aktivitäten von Säugerretroviren besteht keine Klarheit über ihre Zugehörigkeit zu einer bestimmten Proteasefamilie.

Um die aktive Seite des FLV Enzyms näher zu charakterisieren, sind mehreren Versuchsansätzen Proteaseinhibitoren zugesetzt worden. Mit dem Serinproteaseinhibitor PMSF kam es zu keiner Hemmung der proteolytischen Aktivität. Der substratähnliche Inhibitor TPCK inhibierte leicht, bei TLCK und den Thiolproteaseinhibitoren kam es bei den eingesetzten Mengen zu einer eindeutigen Hemmung des Abbaues von SSV p65. Dies führt zu folgenden möglichen Schlüssen:

1. Da der Abbau von SSV p65 und der seiner Zwischenprodukte zu verschiedenen Zeitpunkten der Inkubation mit FLV-Extrakt durch TLCK vollständig unterbunden werden konnte, kommt dafür nur ein einziges Enzym oder mehrere TLCK sensitive Proteasen in Betracht.

2. Im aktiven Zentrum des Enzyms befindet sich Histidin, welches durch TLCK inaktiviert werden kann. Da es sich bei TLCK um einen Serinproteaseinhibitor handelt, läßt die Hemmung des im FLV enthaltenen Enzyms auf eine Serinprotease schließen.
3. Da die Aktivität der im FLV enthaltenen Protease auch durch Thiolproteaseinhibitoren gehemmt wurde, könnte es sich hierbei auch um eine Thiolprotease handeln. Weil aber der Ort der durch DTT reduzierten Disulfidbrücken (am Substrat oder am Enzym) nicht bekannt ist und durch die Zugabe der Inhibitoren das DTT inaktiviert wird, bleibt unklar, ob es sich bei der im FLV gefundenen Protease um eine Thiolprotease handelt.

Um eine genauere Beantwortung dieser Frage zu ermöglichen und die Rolle der Thiolgruppen beim Abbau von SSV p65 zu klären, werden von mir zur Zeit noch Versuche an Immunpräzipitaten durchgeführt.

Neben dem Einsatz unterschiedlicher Detergentien in verschiedenen Konzentrationen war das kurzfristige Erhitzen von Enzym und Substrat eine weitere Möglichkeit, virale Strukturen aufzubrechen und dadurch die Effektivität der "in vitro" Spaltung von SSV p65 zu erhöhen. Eine dafür notwendige Untersuchung der Hitzestabilität der im FLV enthaltenen Protease ergab, daß diese außerordentlich temperaturstabil ist und aufgrund ihrer Struktur nach Hitzedenaturierung über einen längeren Zeitraum renaturieren kann. Eine solche Stabilität gegenüber relativ hohen Temperaturen für längere Zeit ist weder vom AMV p15 noch von den übrigen beschriebenen Enzymen bekannt. Da diese Proteasen niedermolekulare Moleküle darstellen (AMV p15 15.000d, Mo-MuLV ca. 20.000d groß), liegt der Schluß nahe, daß die im FLV enthaltene Protease ebenfalls relativ klein ist und aus nur einer

Proteinkette besteht. Dies würde auch die Fähigkeit des Enzyms, nach Hitzedenaturierung zu renaturieren und biologisch aktiv zu sein, erklären.

Die Hitzestabilität der FLV Protease ermöglichte es, das Enzym-Substratgemisch kurzfristig auf 56°C zu erhitzen, ohne die enzymatische Aktivität zu zerstören. Dadurch konnte die Effektivität des "in vitro" Abbaues von SSV p65 erheblich gesteigert werden. Wurde nur das Substrat oder nur das Enzym erhitzt, kam es zu einem unvollständigen Abbau von SSV p65. Für das nicht erhitzte Substrat bedeutet dies, daß ein Teil des SSV p65 außerhalb des viralen "cores" liegt und dem Enzym nicht zugänglich ist, weshalb bei der Spaltung SSV p40 und SSV p25 entstehen. Die vom Enzym "in vitro" bevorzugte Spaltung zwischen SSV p30 und SSV p10, welche zur Entstehung von SSV p55 und SSV p10 führt, erfolgt nicht. Es ist daher anzunehmen, daß die Spaltstelle dafür im nicht zugänglichen "core" des Virus liegt. Erst nach kurzer Erhitzung des Substrates war auch diese Spaltstelle dem Enzym zugänglich. Erhitzte man nur das Substrat, kam es zu einem schwachen Abbau von SSV p65. Dies dürfte auf eine geringe Menge an freiem Enzym zurückzuführen sein, welche durch NP 40 und das wiederholte Frieren - Tauen der Viruspräparation freigesetzt worden war. Erst das Erhitzen des FLV auf 56°C führte zu einer vermehrten Freisetzung von enzymatischer Aktivität. Diese Experimente führten zu der Annahme, daß die im FLV befindliche Protease im "core" lokalisiert sein könnte.

Nach einer publizierten Methode (19) wurden daher "cores" aus frisch geerntetem Virus gereinigt und es konnte eindeutig gezeigt werden, daß die enzymatische Aktivität tatsächlich im "core" des FLV lokalisiert ist. Mit Hilfe des Elektronenmikroskopes ist zusätzlich noch einerseits die Unversehrtheit des gereinigten Virus und

der gereinigten "cores" und andererseits ihre weitgehende Zerstörung durch Erhitzen nachgewiesen worden. Vom aviären AMV p15 weiß man, daß diese Protease ebenfalls im "core" als virales Strukturprotein vorliegt (9). Die Lokalisation der beim Mo-MuLV gefundenen enzymatischen Aktivität ist nicht bekannt.

Mit der näheren Bestimmung der Lokalisation des im FLV enthaltenen Enzyms ist ein weiterer Schritt zur Klärung der Frage, ob dieses Enzym vom Virus kodiert oder induziert ist, getan. Für ein Virus kodiertes Enzym spricht:

a) SSV p65 wird "in vivo" nach Überinfektion mit dem Helfervirus FLV in seine Endprodukte gespalten.
b) SSV p65 wird auch "in vitro" nach Zugabe eines Virusextraktes gespalten.
c) Die entsprechende Protease ist im viralen "core" lokalisiert; ein zufälliger Einbau des Enzyms bei der Knospung ("budding") des Virus erscheint daher unwahrscheinlich.

Dies sind jedoch nur weitere Hinweise auf ein möglicherweise vom Virus kodiertes Enzym. Erst die Reinigung der Protease, ihre Sequenzierung und der anschließende Vergleich mit der aus der Nukleinsäuresequenz abgeleiteten Aminosäuresequenz des FLV Genoms wird eine endgültige Beantwortung dieser Frage ermöglichen.

## 5. ZUSAMMENFASSUNG

In der vorliegenden Arbeit wurde näher untersucht, ob bei C-Typ Säugerretroviren die Helferviren eine Protease enthalten, welche "in vitro", das heißt im Reagenzglas, ihren "gag precursor" korrekt spalten und ob es Hinweise auf eine vom Virus kodierte oder induzierte Protease gibt.

Hierfür wurde als Enzymquelle ein Extrakt aus Friend Leukämie Virus (FLV) und als Substrat ein vom "simian sarcoma virus" (SSV) kodiertes 65.000d großes Protein (SSV p65) benützt. Dieses Molekül ist sehr eng mit dem "gag precursor" $pr65^{gag}$ des simian sarcoma associated virus (SSAV) verwandt, wird im Gegensatz zu diesem jedoch in der Zelle nicht prozessiert. Mit Hilfe des FLV Extraktes gelang eine korrekte Spaltung von SSV p65 "in vitro". Zur Optimierung des Versuchsansatzes und zur näheren Charakterisierung der im FLV enthaltenen Protease sind (1) verschiedene Versuchsbedingungen wie pH, Inkubationstemperatur, Konzentration des Detergens variiert, (2) der Einfluß eines Reduktionsmittels und (3) verschiedene Wege zur Erhöhung der Zugänglichkeit von Enzym und Substrat getestet worden. Mit Hilfe von Proteaseinhibitoren konnte die Zugehörigkeit zu einer Proteasefamilie bestimmt und die Frage geklärt werden, ob am Abbau von SSV p65 ein oder mehrere verschiedene Enzyme beteiligt sind. Anhand einer Zeitkinetik gelang es, den "in vitro" Hauptabbauweg des SSV p65 zu bestimmen, wobei es jedoch selbst unter sehr spezifischen Markierungsbedingungen nicht möglich war, den Abbau von SSV p25 "in vitro" in SSV p15 und SSV p12 nachzuweisen. Es muß deshalb davon ausgegangen werden, daß es sich beim SSV p25 unter diesen Bedingungen um ein Endprodukt des Abbaues handelt. Wegen der gefundenen außerordentlichen Hitzestabilität des im FLV enthaltenen Enzyms war es möglich, indirekt auf dessen Größe und Struktur zu

schließen. Die FLV assoziierte Protease ließ sich im "core" nachweisen; diese Lokalisation weist auf ein vom Virus kodiertes Enzym hin.

## 6. LITERATURVERZEICHNIS


1. Aaronson, S.A., J.R. Stephenson, S. Hino and S.R. Tronick (1976): Differential expression of helper viral structural polypeptides in cells transformed by clonal isolates of woolly monkey sarcoma virus. J. Virol., 16, 1117-1123.
2. Aaronson, S.A., J.R. Stephenson, S.R. Tronick and S. Hino (1976): Immunological analysis of structural polypeptides of woolly monkey-gibbon ape type-C viruses. In "Comparative Leukemia Research" (J. Clemmesen and D.S. Yohn, eds.). Vol. 43, pp. 102-109, Karger, Basel.
3. Battula, N. and G.J. Todaro (1980): Physical map of infectious baboon type C viral DNA and sites of integration in infected cells. J. Virol., 36, 709-718.
4. Bishop, J.M. (1981): Retroviruses. Ann Rev. Biochem., 47, 35-88.
5. Bonner, W.M. and R.A. Laskey (1974): A film detection method for tritium labelled proteins and nucleic acids in polyacrylamid gels. Eur. J. Biochem., 46, 83-84.
6. Cooper, T.G. (1981): Biochemische Arbeitsmethoden. W. De Gruyter Verlag, Berlin, New York.
7. Crawford, S. and S.P. Goff (1984): Mutations in gag proteins p12 and p15 of Moloney murine leukemia virus block early stages of infection. J. Virol., 49, 908-917.
8. Devare, S.G., E.P. Reddy, J.D. Law, K.C. Robbins and S.A. Aaronson (1983): Nucleotide sequence of the simian sarcoma virus genome: Demonstration that its acquired cellular sequences encoded the transforming gene product $p28^{sis}$. Proc. Natl. Acad. Sci., 80, 731-735.
9. Dittmar, K.J. and K. Moelling (1978): Biochemical properties of p15-associated protease in an avian

RNA tumor virus. J. Virol., 28, 106-118.

10. Edbauer, C.H. and R.B. Naso (1983): Cytoscelleton-associated pr65$^{gag}$ and retrovirus assembly. Virology, 130, 415-426.
11. Evans, L.H., S. Dresler and D. Kabat (1977): Synthesis and glycosylation of polyprotein precursors to the internal core proteins of Friend murine leukemia virus. J. Virol., 19, 865-874.
12. Friend, C. (1957): Cell free transmission in adult swiss mice of a disease having the character of leukemia. J. Exp. Med., 105, 307-318.
13. Gallick, G.E. and R.B. Arlinghaus (1984): Incorporation of lipids into variants of Moloney sarcoma virus, which produce gag-mos fusion proteins. Virology, 133, 228-232.
14. v.d. Helm, K. (1977): Cleavage of Rous sarcoma viral polypeptide precursor into internal structural proteins in vitro involves viral protein p15. Proc. Natl. Acad. Sci., 74, 911-915.
15. Henderson, L.E., H.C. Krutzsch, and S. Oroszlan (1983): Myristyl amino terminal acylation of murine retro-viral proteins: an unusual post-translational protein modification. Proc. Natl. Acad. Sci., 80, 339-343.
16. Jamjoom, G.A., R.B. Naso, R.B. Arlinghaus (1976): Selective decrease in the rate of cleavage of an intracellular precursor to Rauscher leukemia virus p30 by treatment of infected cells with actinomycin D. J. Virol., 19, 1054-1072.
17. Khan, A.S. and J.R. Stephenson (1979): Feline sarcoma virus-coded polyprotein: Enzymatic cleavage by a type C virus-coded structural protein. J. Virol., 29, 649-656.
18. Kopchick, J.J., W.L. Karshin, and R.B. Arlinghaus (1979): Tryptic peptide analysis of gag and gag-pol gene products of Rauscher murine leukemia virus. J. Virol., 30, 610-623.

19. Lange, J., F. Hermann, G. Hunsmann, V. Moennig, R. Wollmann, W. Schäfer (1973): Properties of mouse leukemia viruses. Virology, 53, 457-462.
20. Laemmli, U. (1970): Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage T4. Nature, 227, 680.
21. Lehninger, A.L. (1978): Biochemistry. Worth Publisher, Inc. New York.
22. Lowry,O.H., N.J. Rosebrough, A.C. Farr and R.J. Randall (1951): Protein measurement with the folin phenol reagent. J. Biol. Chem., 193, 265.
23. Maxwell, S. and R.B. Arlinghaus (1981): In vitro proteolytic cleavage of Gazdar murine sarcoma virus $pr65^{gag}$. J. Virol., 39, 963-967.
24. Miller, A.D., and I.M. Verma (1984): Two base changes restore infectivity to a noninfectious molecular clone of Moloney murine leukemia virus (p MLV-1). J. Virol., 49, 214-222.
25. Moelling, K., A. Scott, K. Dittmar and M. Owada (1980): Effect of p15-associated protease from avian RNA tumor virus on avian specific polyprotein precursor. J. Virol., 33, 680-688.
26. Naso, R.B., L.H. Stanker, J.J. Kopchick, V.L.NG. and W.L. Karshin and R.B. Arlinghaus (1983): Further studies on the glycosilated gag gene products of Rauscher murine leukemia virus: Identification of an N-terminal 45.000 dalton cleavage product. J. Virol., 45, 1200-1206.
27. Seifert, E., Claviez, M., H. Frank, G. Hunsmann, H. Schwarz und W. Schäfer (1975): XII. Produktion größerer Mengen von Friend-Virus durch eine permanente Zell-Suspensionskultur (Eveline-Suspensionszellen). Z. Naturforsch., 30c, 698-700.
28. Schultz, A., E.H. Rabin and S. Oroszlan (1979). Post-translational modification of Rauscher leukemia virus precursor polyproteins encoded by the gag gene. J. Virol., 255-266.

29. Schultz, A. and S. Oroszlan (1983): In vivo modification of retroviral gag gene-encoded polyproteins by myristic acid. J. Virol., 46, 355-361.
30. Schultz, A. and S. Oroszlan (1984): Myristilation of gag-onc fusion proteins in mammalian transforming retroviruses. Virology, 133, 431-437.
31. Schwartzberg, P., J. Colicelli and S.Goff (1983): Deletion mutants of Moloney murine leukemia virus which lack glycosilated gag protein are replication competent. J. Virol., 46, 538-546.
32. Soong, M.M., P.H. Yuen, and P.K.Y. Wong (1984): Isolation and characterization of a Mo-MuSV transformed TB cell line that produces noninfectious MuSV particles with uncleaved gag protein which is processed in the presence of Mo-MuLV. Virology, 132, 390-400.
33. Theilen, G.H., D. Gould, M. Fowler, D.C. Dungworth (1971): C-type virus in tumor tissue of a woolly monkey (Lagothrix spp.) with fibrosarcoma. J. Natl. Cancer Inst., 47, 881-889.
34. Thiel, H.-J., T.J. Matthews, E.M. Broughton, K.J. Weinhold, D.P. Bolognesi, T. Graf and H. Beug (1981): Clonal isolate of the simian sarcoma virus codes for a gag related 65.000 dalton protein. Virology, 114, 124-131.
35. Thiel, H.-J., F. Weiland, R. Hafenrichter, T.J. Matthews and K.J. Weinhold (1982): Intracellular cleavage of an SSV gag related protein. Virology, 123, 229-234.
36. Traktman, P., and D. Baltimore (1982): Protease bypass of temperature-sensitive murine leukemia virus maturation mutants. J. Virol., 44, 1039-1046.
37. Vogt, V.M., R. Eisenmann and H.Diggelmann (1975): Generation of avian myeloblastosis virus structural proteins by proteolytic cleavage of a precursor polypeptide. J. Mol. Biol., 96, 471-493.
38. Vogt, V.M., A. Wight and R. Eisenmann (1979): In

vitro cleavage of avian retrovirus gag proteins by viral protease p15. Virology, 98, 154-167.

39. Vogt, V.M., D.A. Bruckenstein and A.P. Bell (1982): Avian sarcoma virus gag precursor polypeptide is not processed in mammalian cells. J. Virol., 44, 725-730.
40. Watson, J.D., B. Alberts, D. Bray, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts (1983): Molecular biology of the cell. Garland Publishing, Inc., New York and London.
41. Yoshinaka, Y. and R.B. Luftig (1977): Properties of a p70 proteolytic factor of murine leukemia viruses. Cell, 12, 709-719.
42. Yoshinaka, Y. and R.B. Luftig (1977): Characterization of Rauscher leukemia virus (RLV) p40-42, an intermediate cleavage product of the group specific antigen (gag) precursor polypeptide, p65-70. Biochem. Biophys. Res. Comm., 79, 319-ff.
43. Yoshinaka, Y. and R.B. Luftig (1977): Murine leukemia virus morphogenesis: Cleavage of p70 in vitro can be accompanied by a shift from a concentrically coiled internal strand ("immature") to a collapsed ("mature") form of the virus core. Proc. Natl. Acad. Sci., 74, 3446-3450.
44. Yoshinaka, Y. and R.B. Luftig (1980): Physico-chemical characterization and specifity of the murine leukemia virus $pr65^{gag}$ proteolytic factor. J. gen. Virol., 48, 329-340.
45. Yoshinaka, Y. and R.B. Luftig (1981): Inhibition of murine leukemia virus $pr65^{gag}$ cleavage in vitro and in vivo by hypertonic medium. J. Virol., 37, 1066-1070.
46. Yoshinaka, Y. and R.B. Luftig (1981): A comparison of avian and murine retrovirus polyprotein cleavage activities. Virology, 111, 239-250.
47. Yoshinaka, Y. and R.B. Luftig (1981): Cleavage of Rauscher leukemia virus (R-MuLV) $pr65^{gag}$ by the

Moloney leukemia virus (Mo-MuLV) proteolytic activity produces the R-MuLV specific but not the MO-MuLV specific 40 000 dalton intermediate polypeptide. J. gen. Virol., 54, 33-38.

48. Yoshinaka, Y. and R.B. Luftig (1982): p65 of Gazdar murine sarcoma virus contains antigenic determinants from all four of the murine leukemia virus (MuLV) gag polypeptides (p15, p12, p30 and p10) and can be cleaved in vitro by the MuLV proteolytic activity. Virology, 118, 380-388.

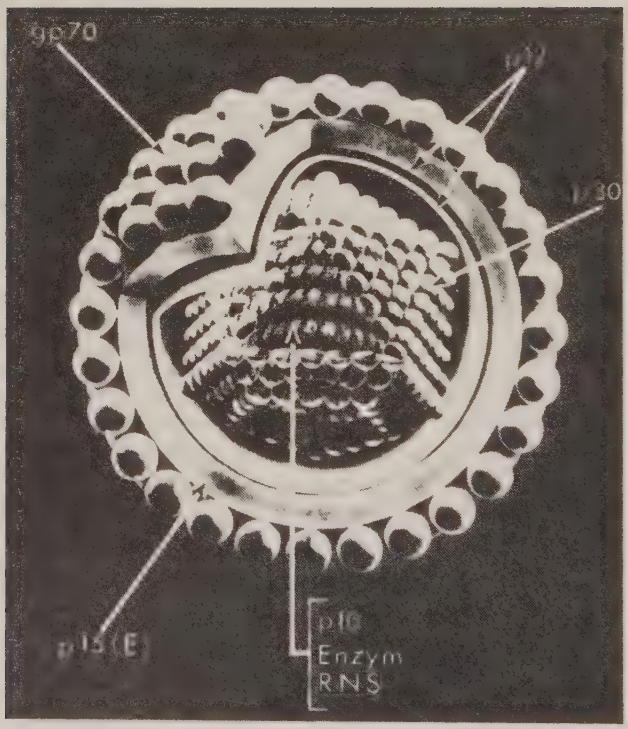


Abb.1

Modell eines Retrovirus. Die Pfeile geben die Lokalisation einiger viraler Proteine an.

Virales Genom

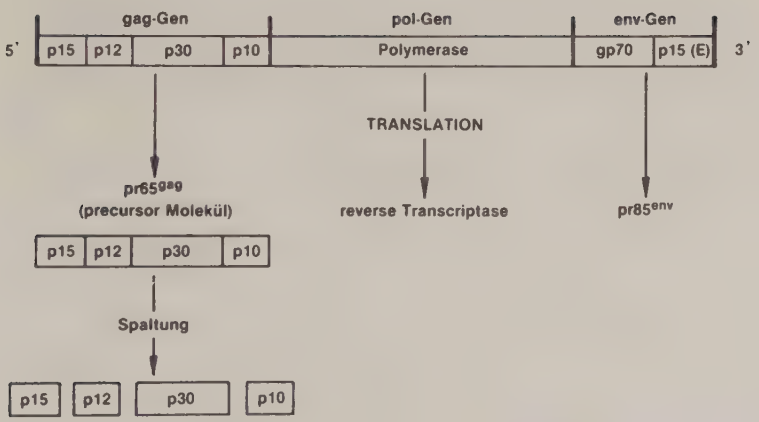


Abb.2a

Allgemeines Schema eines Retrovirusgenoms und die von ihm kodierten viralen Proteine. Dabei ist die Entstehung der "gag" Proteine besonders vorgehoben.

Mögliche Wege des Abbaues von SSAV pr65$^{gag}$

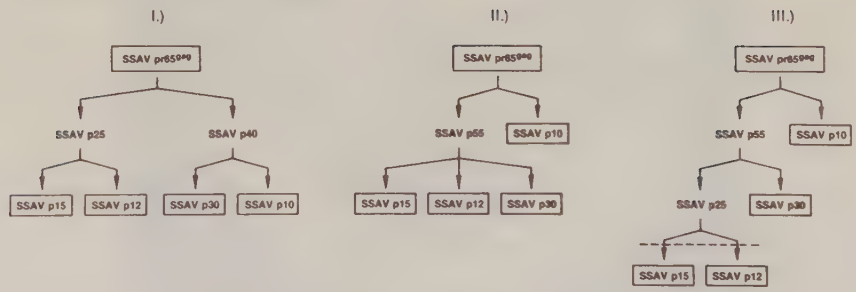


Abb.2b

Mögliche Wege des Abbaues von SSAV pr65$^{gag}$. Bei diesem Schema stellen SSAV p55, SSAV p40 und SSAV p25 Zwischenprodukte beim Abbau SSAV pr65$^{gag}$ dar. Sie setzen sich folgendermaßen zusammen:

1. SSAV p55 aus SSAV p30, SSAV p15 und SSAV p12
2. SSAV p40 aus SSAV p30 und SSAV p10
3. SSAV p25 aus SSAV p15 und SSAV p12

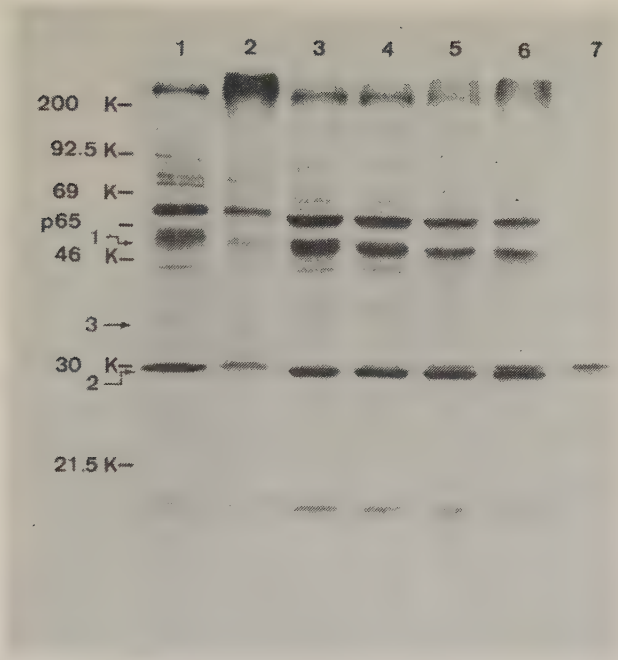


Abb.3

"in vitro" Abbau von SSV p65 bei verschieden langen Inkubationszeiten durch FLV, analysiert auf einer 7,5%-20% SDS-PAGE. Ausgangsmaterial: $^{3}$H-Leucin markierte C2-Partikel mit ungespaltenem SSV p65 (1); Ausgangsmaterial ohne FLV unter Versuchsbedingungen für 27h inkubiert (2); SSV p65 mit FLV für 1h inkubiert (3); mit FLV für 3h inkubiert (4); mit FLV für 9h inkubiert (5); und mit FLV für 27h inkubiert (6); SSAV p30 und NRK p27 mit einem Kaninchen anti FLV p30 aus NRK-SSAV Zellen immunpräzipitiert (7). Die Angaben am linken Rand bezeichnen das SSV p65, die Zwischenprodukte SSV p55 (1), SSV p40 (3) und das Endprodukt SSV p30 (2). Die Molekulargewichtsmarker sind Myosin (200 K), Phosphorylase b (92,5 K), Bovines Serum Albumin (69 K), Ovalbumin (64), Carboanhydrase (30 K) und Soybean Trypsin Inhibitor (21,5 K).

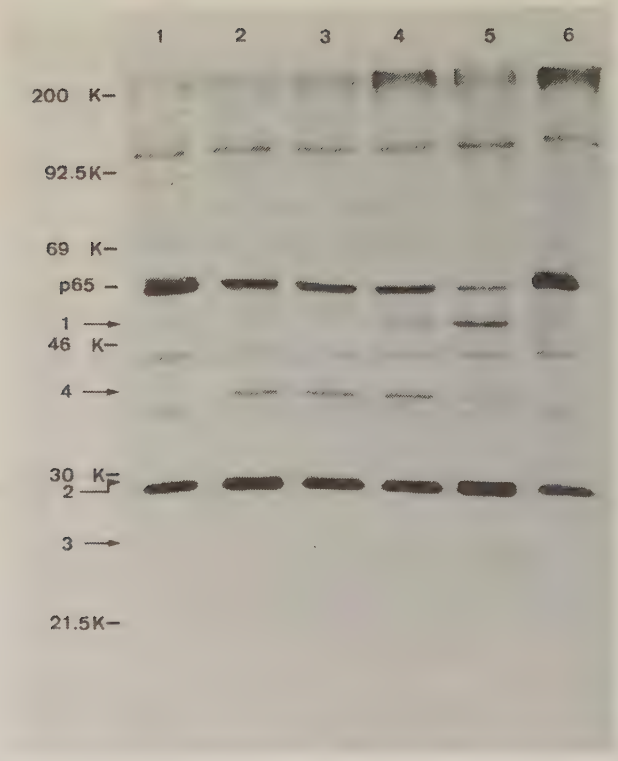


Abb.4

Verschiedene Behandlungen des Testansatzes. Ausgangsmaterial: $^{3}$H-Leucin markierte C2-Partikel mit ungespaltenem SSV p65 (1); Inkubation des Versuchsansatzes unter den Ausgangsbedingungen (2); mit vorher kurzfristig erhitzem FLV inkubiert (3); mit vorher kurzfristig erhitztem Substrat inkubiert (4); mit vorher erhitztem Substrat und vorher erhitzter Enzymquelle inkubiert (5); Startmaterial ohne FLV unter Versuchsbedingungen als Kontrolle inkubiert (6). Die Angaben links bezeichnen SSV p65, die Zwischenprodukte SSV p55 (1), SSV p40 (4), SSV p25 (3) und das Endprodukt SSV p30 (2). Die Molekulargewichtsstandards sind die gleichen wie bei Abb.3.

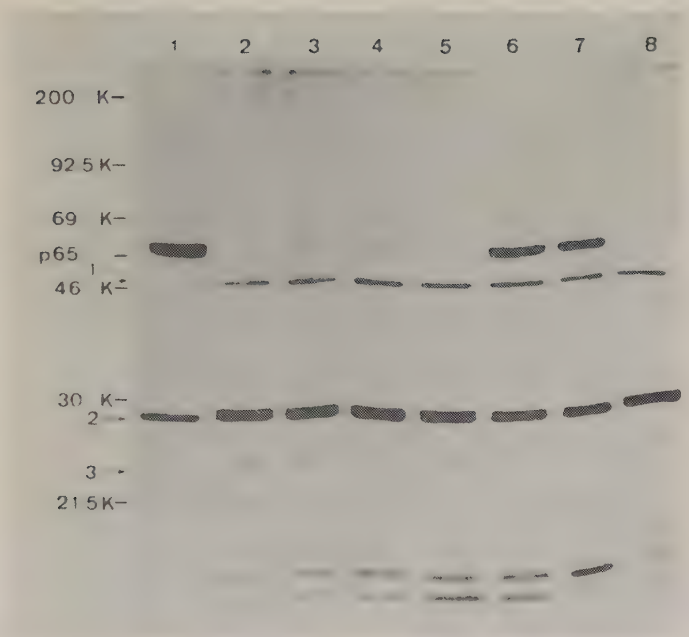


Abb.5

Auswirkungen verschiedener NP 40 Konzentrationen im Versuchsansatz. Ausgangsbedingungen: $^{3}$H-Leucin markierte C2-Partikel mit ungespaltenem SSV p65 (1); Versuchsansätze mit 1% NP 40 (2); 0.5% NP 40 (3); 0.3% NP 40 (4); 0.1% NP 40 (5); ohne NP 40, jedoch einmal mit beschallen (6) und ohne beschallen (7) und mit 2% NP 40 (8). Die Angaben links beziehen sich auf SSV p65, seine Zwischenprodukte SSV p55 (1), SSV p25 (3) und das Endprodukt SSV p30 (2). Die Molekulargewichtsmarker sind die gleichen wie bei Abb.3.

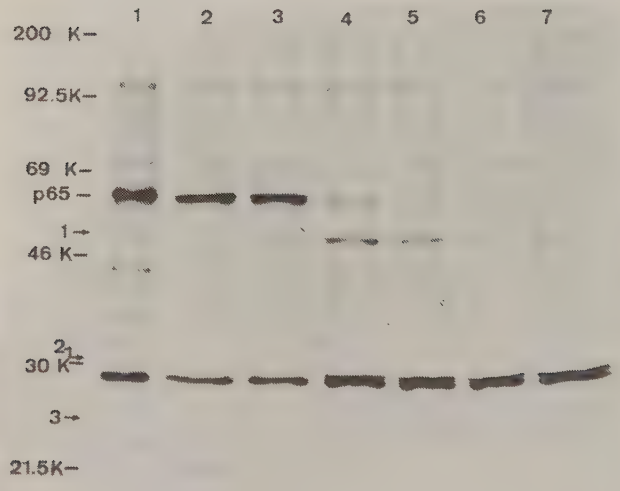


Abb.6

Inkubation bei verschiedenen pH Werten. Ausgangsmaterial: $^{3}$H-Leucin markierte C2-Partikel mit ungespaltenem SSV p65 (1); Inkubation bei pH 5.5 (2); pH 6.0 (3); pH 6.5 (4 und 5); pH 7.0 (6); pH 7.5 (7). Die Angaben links beziehen sich auf SSV p65,seine Zwischenprodukte SSV p55 (1), SSV p25 (3) und das Endprodukt SSV p30 (2). Die Molekulargewichtsmarker sind die gleichen wie bei Abb.3.

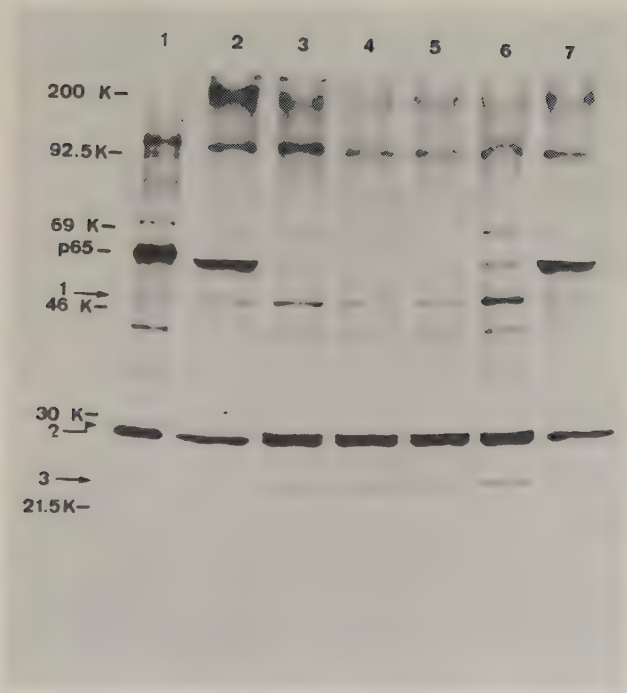


Abb.7

DTT Abhängigkeit der "in vitro" Spaltung von SSV p65. Ausgangsmaterial: $^{3}$H-Leucin markierte C2-Partikel mit ungespaltenem SSV p65 (1). Proben mit 1 mM DTT (2); 5 mM DTT (3); 10 mM DTT (4); 50 mM DTT (5) und 100 mM DTT (6). Kontrolle ohne FLV unter ansonsten gleichen Bedingungen inkubiert (7). Die Angaben links bezeichnen SSV p65, seine Zwischenprodukte SSV p55 (1), SSV p25 (3) und das Endprodukt SSV p30 (2). Die Molekulargewichtsmarker sind die gleichen wie bei Abb.3.

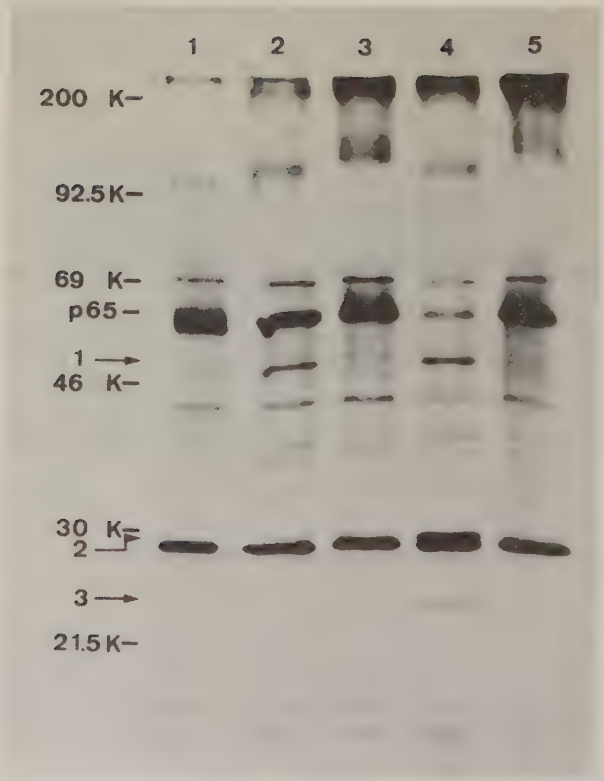


Abb.8a

Verschiedene Inkubationstemperaturen. Ausgangsmaterial: $^{3}$H-Leucin markierte C2-Partikel mit ungespaltenem SSV p65 (1), Inkubation bei 4°C (2) und die Kontrolle ohne FLV unter den gleichen Bedingungen (3), Inkubation bei 25°C (4) und die Kontrolle ohne FLV unter den gleichen Bedingungen (5). Die Angaben links bezeichnen SSV p65, seine Zwischenprodukte SSV p55 (1), SSV p25 (3) und das Endprodukt SSV p30 (2). Die Molekulargewichtsmarker sind die gleichen wie bei Abb.3.

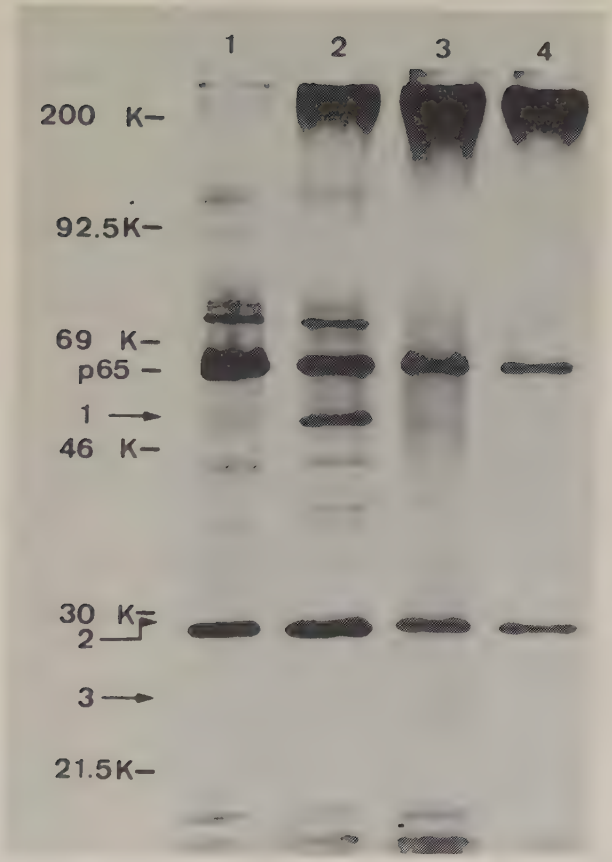


Abb.8b

Verschiedene Inkubationstemperaturen. Ausgangsmaterial: $^{3}$H-Leucin markierte C2-Partikel mit ungespaltenem SSV p65. Kontrollen ohne FLV inkubierte bei 37°C (1) und bei 56°C (4). Proben mit FLV inkubiert bei 37°C (2) und bei 56°C (3). Die Angaben links bezeichnen SSV p65, seine Zwischenprodukte SSV p55 (1), SSV p25 (3) und das Endprodukt SSV p30 (2). Die Molekulargewichtsmarker sind die gleichen wie bei Abb.3.

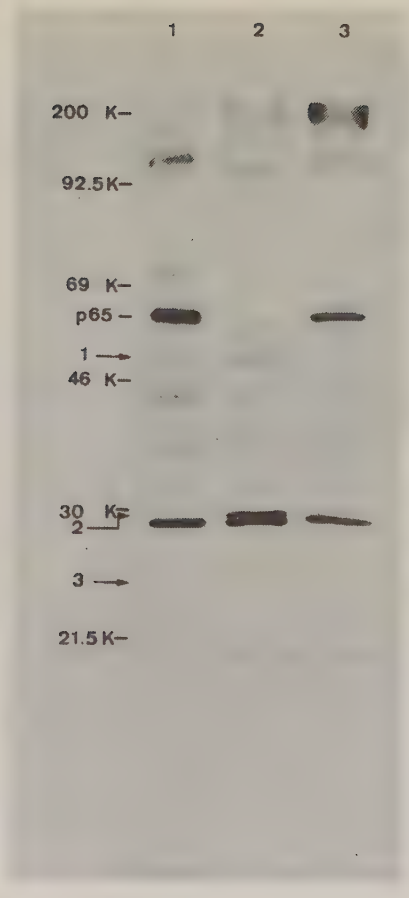


Abb.9

SSV p65 Spaltung unter optimierten Bedingungen. Ausgangsmaterial: $^{3}$H-Leucin markierte C2-Partikel mit ungespaltenem SSV p65 (1). Der Abbau von SSV p65 nach 27h (2) und die unter ansonsten gleichen Bedingungen, jedoch ohne FLV inkubierte Kontrolle (3). Die Angaben links bezeichnen SSV p65, seine Zwischenprodukte SSV p55 (1), SSV p25 (3) und das Endprodukt SSV p30 (2). Die Molekulargewichtsmarker sind die gleichen wie in Abb.3.

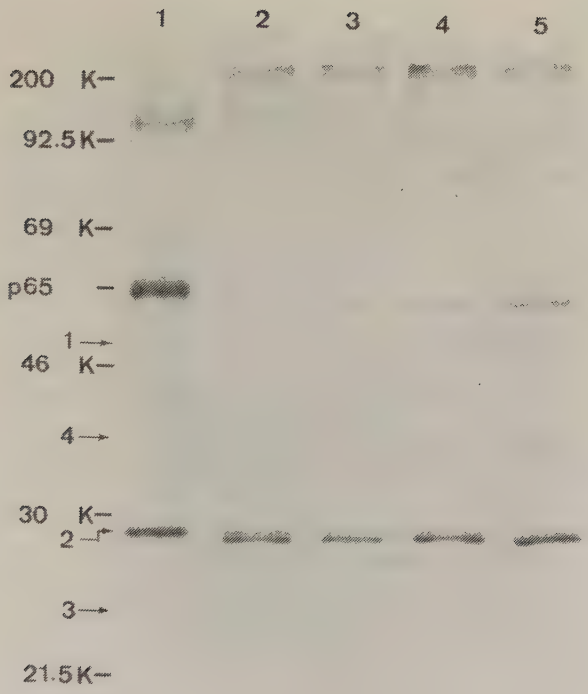


Abb.10

Temperaturstabilität der im FLV enthaltenen Protease während verschieden langer Vorinkubationszeiten bei 56°C. Ausgangsmaterial: $^{3}$H-Leucin markierte C2-Partikel mit ungespaltenem p65 (1). Vorinkubation des FLV Extraktes ohne Substrat bei 56°C für fünf Minuten (2), für zwanzig Minuten (3), für achtzig Minuten (4) und für zweihundertundvierzig Minuten (5). Anschließend wurden diese Proben mit Substrat für 24h inkubiert. Die Angaben links beziehen sich auf SSV p65, seine Zwischenprodukte SSV p55 (1), SSV p40 (4), SSV p25 (3) und das Endprodukt SSV p30 (2). die Molekulargewichtsmarker sind die gleichen wie bei Abb.3.

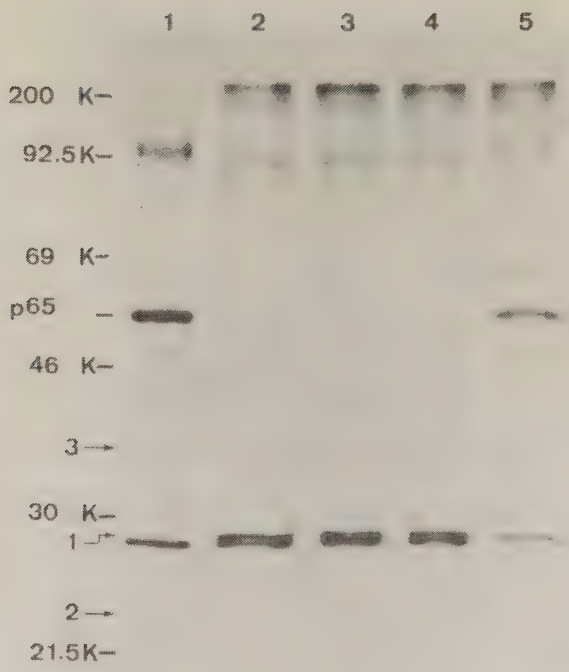


Abb.11

Temperaturstabilität der im FLV enthaltenen Protease bei verschieden langer Vorinkubation bei 95°C. Ausgangsmaterial: $^{3}$H-Leucin markierte C2-Partikel mit ungespaltenem SSV p65 (1). Vorinkubation des FLV Extraktes bei 95°C für fünf Minuten (2), zwanzig Minuten (3), achtzig Minuten (4) und für zweihundertundvierzig Minuten (5). Danach wurden die Proben mit Substrat für 24h inkubiert. Die Angaben links bezeichnen SSV p65, seine Zwischenprodukte SSV p40 (3), SSV p25 (2) und das Endprodukt SSV p30 (1). Die Molekulargewichtsmarker sind die gleichen wie in Abb.3.

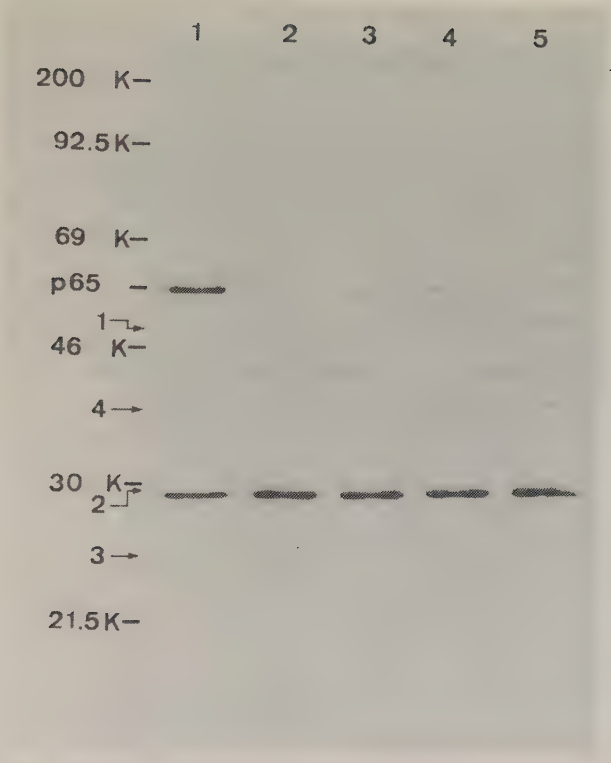


Abb.12

Temperaturstabilität des im FLV enthaltenen Enzyms bei niederen Temperaturen. Ausgangsmaterial: $^{3}$H-Leucin markierte C2-Partikel mit ungespaltenem SSV p65 (1). FLV unter normalen Bedingungen behandelt (2), FLV zweimal gefroren und wieder aufgetaut (3), FLV viermal gefroren und wieder aufgetaut (4) und FLV achtmal gefroren und wieder aufgetaut (5), bevor es im Versuch eingesetzt wurde. Die Angaben links bezeichnen SSV p65, SSV p55 (1), SSV p40 (4), SSV p25 (3) und das Endprodukt SSV p30 (2). Die Molekulargewichtsmarker sind die gleichen wie in Abb.3.

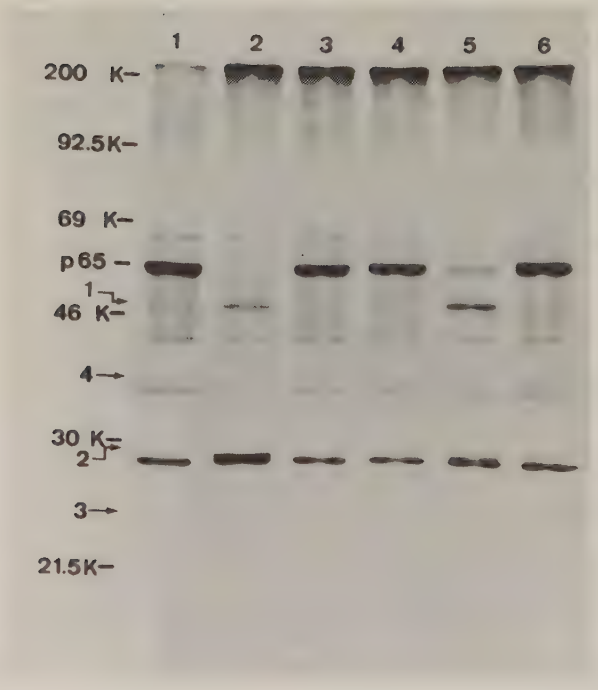


Abb.13

Wirkung verschiedener Detergentien auf die enzymatische Aktivität der im FLV enthaltenen Protease. Ausgangsmaterial: $^{3}$H-Leucin markierte C2-Partikel mit ungespaltenem SSV p65 (1). Versuchsansatz mit 1% NP 40 (2), mit 1% NP 40 und 0.1% SDS (3), mit 1% NP 40 und 0.5% DOC (4), mit 1% NP 40 und 0.1 DOC (5) und nur mit 0.5% DOC (6). Die Angaben links bezeichnen SSV p65, SSV p55 (1), SSV p40 (4), SSV p25 (3) und das Endprodukt SSV p30 (2). Die Molekulargewichtsmarker sind die gleichen wie in Abb.3.

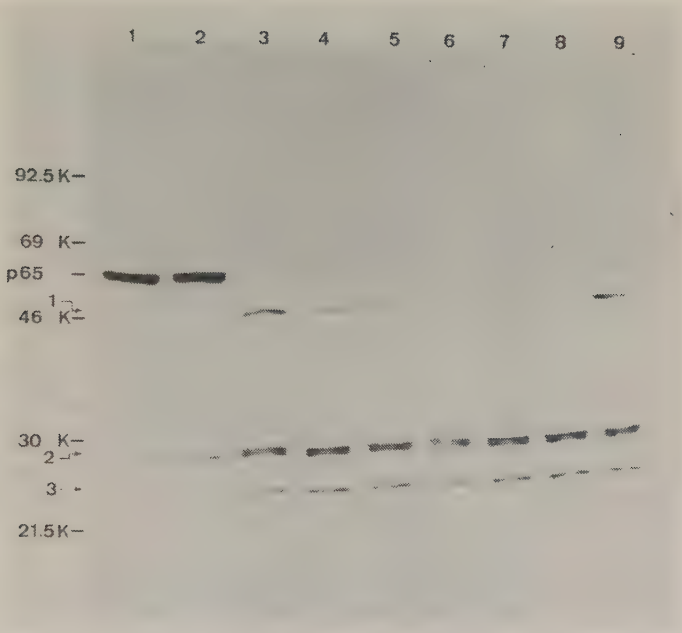


Abb.14

Einfluß verschiedener Inhibitoren auf die im FLV enthaltene Protease. Ausgangsmaterial: $^{3}$H-Leucin markierte C2-Partikel mit ungespaltenem SSV p65 (1). Versuchsansatz mit 10 mM TLCK für 1.5h vorinkubiert, danach mit Substrat inkubiert (2), mit 2 mM TPCK für 1.5h vorinkubiert, danach mit Substrat inkubiert (4) und mit 3 mM PMSF für 1.5h vorinkubiert, danach mit Substrat inkubiert (6). Proben, denen der Inhibitor erst nach einer Inkubation des gesamten Versuchsansatzes für 3h zugefügt wurde: TLCK (3), TPCK (5) und PMSF (7). In Spur 8 ist eine Kontrolle ohne Inhibitor inkubiert, in Spur 9 eine nach 3h gestoppte Probe zu sehen. Die Angaben links bezeichnen SSV p65, SSV p55 (1), SSV p25 (3) und das Endprodukt SSV p30 (2). Die Molekulargewichtsmarker sind die gleichen wie in Abb.3.

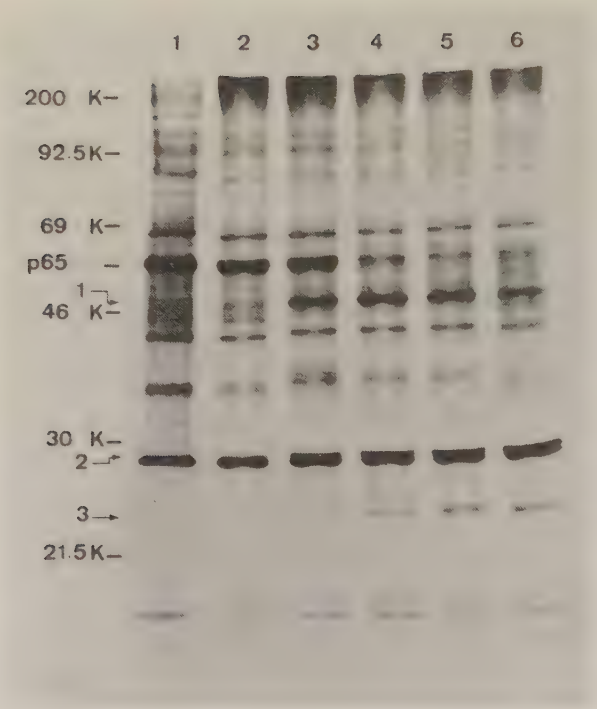


Abb.15

Zugabe des Inhibitors TLCK zu verschiedenen Zeitpunkten der Inkubation. Ausgangsmaterial: $^{3}$H-Leucin markierte C2-Partikel mit ungespaltenem SSV p65 (1). Inkubation des Versuchsansatzes ohne Substrat mit TLCK und anschließender Zugabe des Substrates (2), Zugabe des Inhibitors nach 1.5h Inkubation des gesamten Versuchsansatzes (3), Zugabe des Inhibitors nach 4.5h Inkubation des gesamten Versuchsansatzes (4), Zugabe des Inhibitors 9h nach Inkubation des gesamten Versuchsansatzes (5) und eine Kontrolle ohne Inhibitor inkubiert (6). Die Angaben links bezeichnen SSV p65, SSV p55 (1), SSV p25 (3) und das Endprodukt SSV p30 (2). Die Molekulargewichtsmarker sind die gleichen wie bei Abb.3.

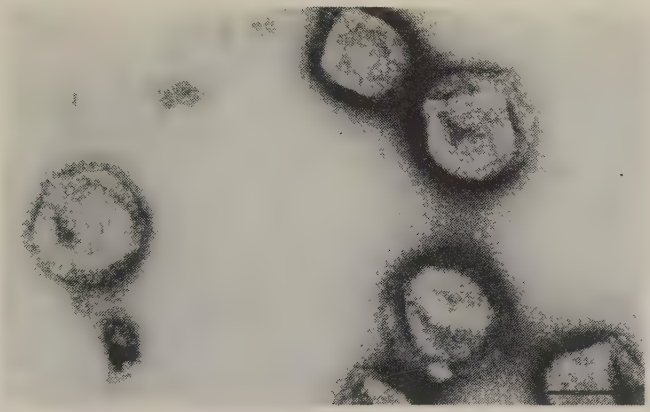

Abb.16a

Elektronenmikroskopische Aufnahme einer Präparation gereinigter FLV Viren. Es sind deutlich die zum großen Teil intakten Viruspartikel zu erkennen. (150 000 x Vergrößerung).

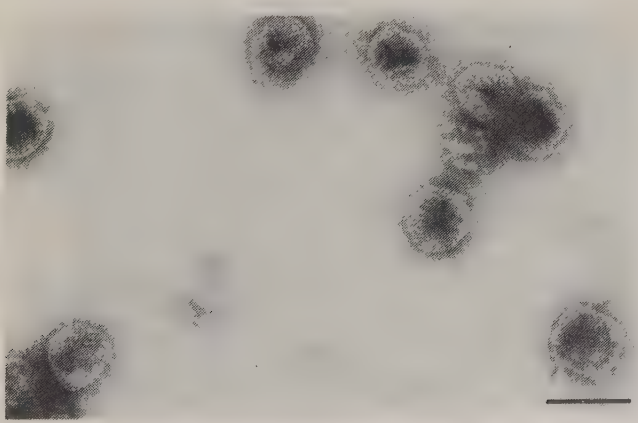

Abb.16b

Elektronenmikroskopische Aufnahme einer Präparation gereinigter FLV "cores". Die Präparation besteht weitgehend aus intakten "cores". (150 000 x Vergrößerung).

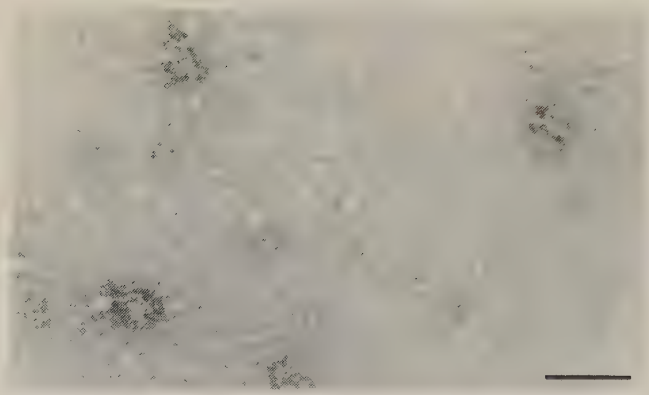

Abb.16c

Elektronenmikroskopische Aufnahme einer FLV Präparation nach einer fünf Minuten dauernden Erhitzung auf 56°C. Es sind keine viralen Strukturen, sondern nur noch Trümmer zu erkennen. (150 000 x Vergrößerung).

Abb.16d

Elektronenmikroskopische Aufnahme einer Präparation von FLV "cores" nach einer fünf minütigen Erhitzung auf 56°C. Die viralen Strukturen sind vollständig zerstören, es liegen nur noch Trümmer vor. (150 000 x Vergrößerung).

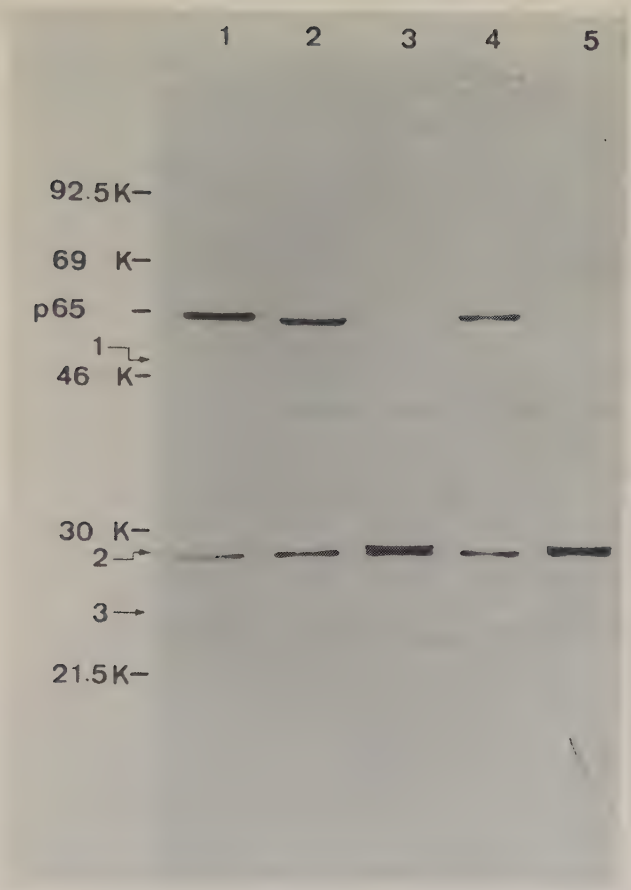


Abb.17

Lokalisation der enzymatischen Aktivität im FLV. Ausgangsmaterial $^{3}$H-Leucin markierte C2-Partikel mit ungespaltenem SSV p65 (1). Versuchsansatz mit intaktem Virus inkubiert (2), mit behandeltem Virus inkubiert (3), mit intakten "cores" inkubiert (4) und mit behandelten "cores" inkubiert (5). Die Angaben links bezeichnen SSV p65, SSV p55 (1), SSV p25 (3) und das Endprodukt SSV p30 (2). Die Molekulargewichtsmarker sind die gleichen wie in Abb.3.

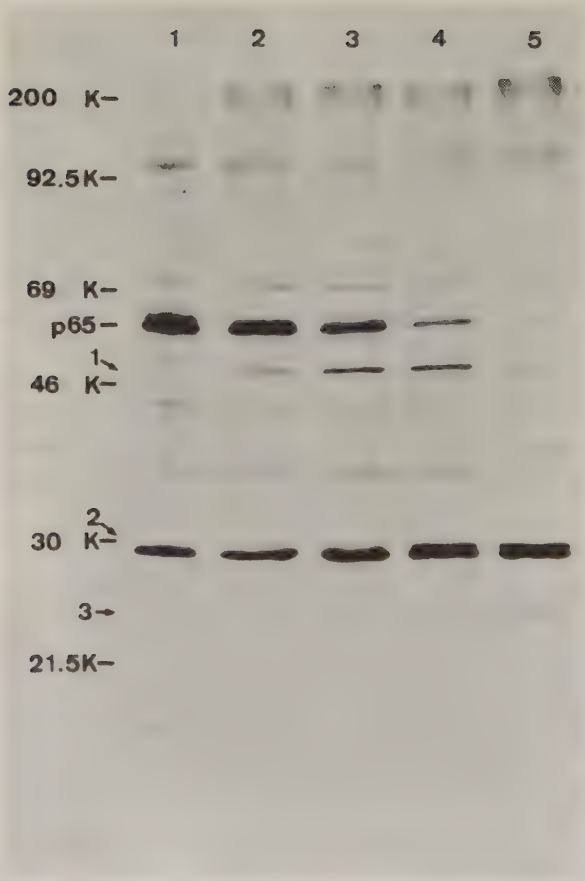


Abb.18

$^{3}$H-Leucin Kinetik. Ausgangsmaterial: $^{3}$H-Leucin markierte C2-Partikel mit ungespaltenem SSV p65 (1). Inkubation des gesamten Versuchsansatzes für 1h (2), 3h (3), 9h (4) und 27h (5). Die Angaben links bezeichnen SSV p65, SSV p55 (1), SSV p25 (3) und das Endprodukt SSV p30 (2). Die Molekulargewichtsmarker sind die gleichen wie bei Abb.3.

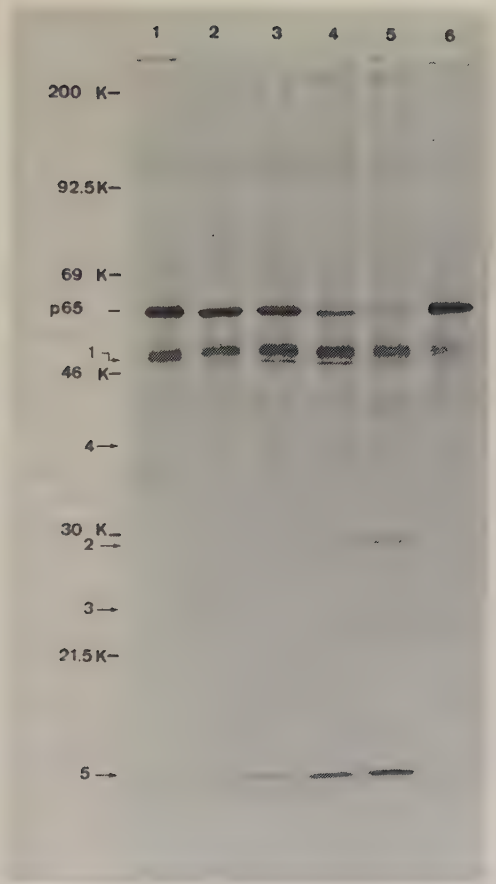


Abb.19

$^{35}$S-Cystein-Kinetik. Ausgangsmaterial: $^{35}$S-Cystein markierte C2-Partikel mit ungespaltenem SSV p65 (1). Inkubation des gesamten Versuchsansatzes für 1h (2), 3h (3), 9h (4) und 27h (5). Eine ohne FLV für 27h inkubierte Kontrolle ist in Spur (6) zu sehen. Die Angaben links bezeichnen SSV p65, SSV p55 (1), SSV p40 (4), SSV p25 (3) und die Endprodukte SSV p30 (2) und SSV p10 (5). Die Molekulargewichtsmarker sind die gleichen wie in Abb.3.

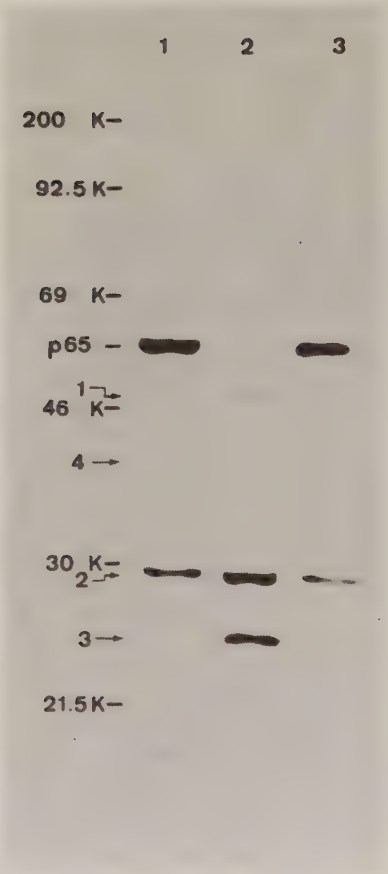


Abb.20

Spaltung von $^{3}$H-Prolin markiertem SSV p65. Ausgangsmaterial: $^{3}$H-Prolin markierte C2-Partikel mit ungespaltenem SSV p65 (1), Inkubation eines Kontrollansatzes ohne FLV für 27h (3) und Inkubation eines Versuchsansatzes mit FLV für 27h (2). Die Angaben links bezeichnen SSV p65, SSV p55 (1), SSV p30 (2), SSV p25 (3) und SSV p40 (4). Die Molekulargewichtsmarker sind die gleichen wie in Abb.3.

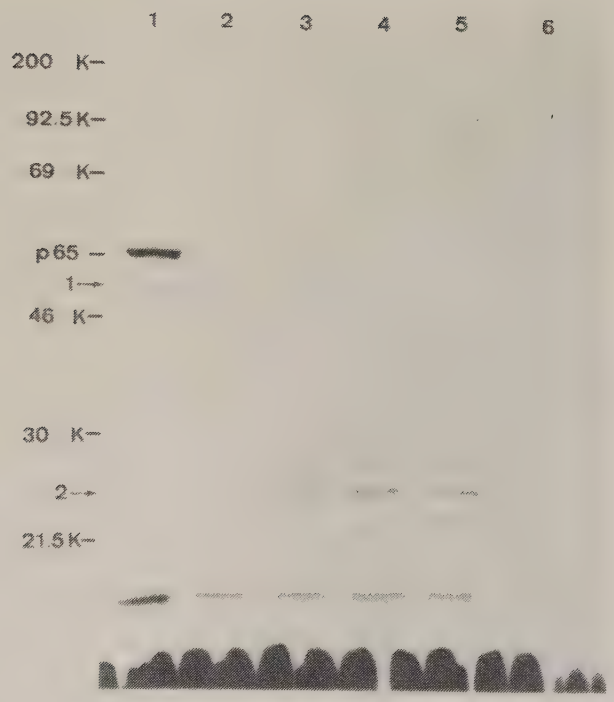


Abb.21

Abbaukinetik von $^{3}$H-myristic acid markiertem SSV p65. Ausgangsmaterial: $^{3}$H-myristic acid markierte C2-Partikel mit ungespaltenem SSV p65 (1). Inkubation des Versuchsansatzes für 4h (2), 8h (3), 12h (4), 24h (5) und 48h (6) mit FLV. Die Angaben links bezeichnen SSV p65, SSV p55 und SSV p25. Die Molekulargewichtsmarker sind die gleichen wie in Abb.3.

Lebenslauf

Rudolf Karl Hafenrichter
geboren am 25. März 1953
in Heidelberg

Schulbesuch:

| | |
|---|---|
| 1960 - 1964 | Volksschule in Heidelberg |
| 1965 - 1973 | Kurfürst-Friedrich-Gymnasium in Heidelberg |
| 20.06.1973 | Erlangung der Hochschulreife |

Hochschulausbildung:

| | |
|---|---|
| März 1977 - April 1982 | Studium der Fachrichtung Biologie Diplom an der Eberhard-Karls-Universität in Tübingen |
| Mai 1982 - Juli 1984 | Anfertigung der vorliegenden Arbeit im Institut für Impfstoffe der Bundesforschungsanstalt für Viruskrankheiten der Tiere in Tübingen unter Anleitung von Herrn Dr. H.-J. Thiel und Herrn Prof. Dr. U.H. Koszinowski |

Meine akademischen Lehrer waren:

Ammermann, D., Apfelbach, R., Bardele, Ch.-F., Braun, V., Bunke, D., Erkert, H., Grell, K.G., Hager, A., Harder, W., Kulzer, E., Möhres, F.P., Netzel, H., Oberwinkler, F., Pfeifer, W., Rossbach, W., Rähle, W., Schnitzler, H.-U. Schwemmle, B., Seitz, H.U.